

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 692 592

②1 N° d'enregistrement national :

92 07493

⑤1 Int Cl⁵ : C 12 N 15/31, 1/21, C 12 P 21/02 (C 12 N 15/31, C 12 R 1:36)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

⑫

②2 Date de dépôt : 19.06.92.

③0 Priorité :

④3 Date de la mise à disposition du public de la demande : 24.12.93 Bulletin 93/51.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : PASTEUR MERIEUX Sérums et Vaccins société anonyme — FR et TRANSGENE (S.A.) société anonyme — FR.

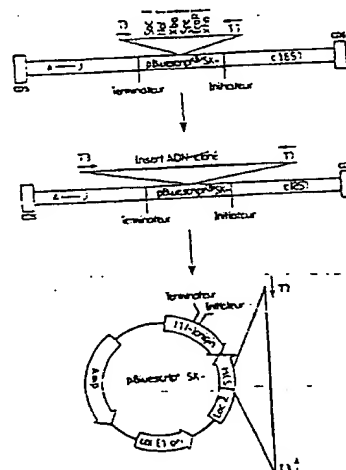
⑦2 Inventeur(s) : Jacobs Eric, Legrain Michèle, Mazarin Véronique, Bouchon-Theisen Bernadette, Shryvers Anthony B. et Bloch Marie-Aline.

⑦3 Titulaire(s) :

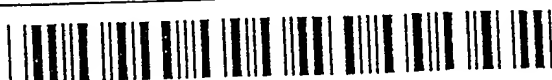
⑦4 Mandataire : Cabinet Lemoine et Bernasconi.

⑤4 Fragments d'ADN codant pour les sous-unités du récepteur de la transferrine de Neisseria meningitidis et procédés les exprimant.

⑤7 La présente invention a pour objet un fragment d'ADN codant pour une protéine capable d'être reconnue par un antisérum anti-récepteur de la transferrine de la souche de N. meningitidis IM2394 ou IM2169 ainsi d'un procédé d'obtention de ladite protéine par voie recombinante. A titre d'exemple, un tel fragment d'ADN code pour la sous-unité *tbp1* de la souche IM2394 ou IM2169 ou pour la sous-unité *tbp2* de la souche IM2394 ou IM2169.



FR 2 692 592 - A1



This Page Blank (uspto)

La présente invention a pour objet des fragments d'ADN de *Neisseria meningitidis* codant pour les sous-unités du récepteur de la transferrine ainsi qu'un procédé de fabrication de chacune des sous-unités par voie recombinante.

5

D'une manière générale, les méningites sont soit d'origine virale, soit d'origine bactérienne. Les bactéries principalement responsables sont : *N. meningitidis* et *Haemophilus influenzae*, respectivement impliquées dans environ 40 et 50 % des cas de méningites bactériennes.

10

On dénombre en France, environ 600 à 800 cas par an de méningites à *N. meningitidis*. Aux Etats-Unis, le nombre de cas s'élève à environ 2 500 à 3 000 par an.

15

L'espèce *N. meningitidis* est subdivisée en sérogroupes selon la nature des polysaccharides capsulaires. Bien qu'il existe une douzaine de sérogroupes, 90 % des cas de méningites sont attribuables à 3 sérogroupes : A, B et C.

20

Il existe des vaccins efficaces à base de polysaccharides capsulaires pour prévenir les méningites à *N. meningitidis* sérogroupes A et C. Ces polysaccharides tels quels ne sont que peu ou pas immunogéniques chez les enfants de moins de 2 ans et n'induisent pas de mémoire immunitaire. Toutefois, ces inconvénients peuvent être surmontés en conjuguant ces polysaccharides à une protéine porteuse.

25

Par contre, le polysaccharide de *N. meningitidis* groupe B n'est pas ou peu immunogène chez l'homme, qu'il soit sous forme conjuguée ou non. Ainsi, il apparait hautement souhaitable de rechercher un vaccin à l'encontre des méningites induites par *N. meningitidis* notamment du séro groupe B autre qu'un vaccin à base de polysaccharide.

30

A cette fin, différentes protéines de la membrane externe de *N. meningitidis* ont déjà été proposées. Il s'agit en particulier du récepteur membranaire de la transferrine humaine.

35

5 D'une manière générale, la grande majorité des bactéries ont besoin de fer pour leur croissance et elles ont développé des systèmes spécifiques d'acquisition de ce métal. En ce qui concerne notamment *N. meningitidis* qui est un pathogène strict de l'homme, le fer ne peut être prélevé qu'à partir de protéines humaines de transport du fer telles que la transferrine et la lactoferrine puisque la quantité de fer sous forme libre est négligeable chez l'homme (de l'ordre de 10^{-18} M), en tout cas insuffisante pour permettre la croissance bactérienne.

10 Ainsi, *N. meningitidis* possède un récepteur de la transferrine humaine et un récepteur de la lactoferrine humaine qui lui permettent de fixer ces protéines chélatrices du fer et de capter par la suite le fer nécessaire à sa croissance.

15 Le récepteur de la transferrine de la souche *N. meningitidis* B16B6 a été purifié par Schryvers et al (WO 90/12591) à partir d'un extrait membranaire. Cette protéine telle que purifiée apparait essentiellement constituée de 2 types de polypeptides : un polypeptide d'un poids moléculaire apparent élevé de 100 kD et un polypeptide d'un poids moléculaire apparent
20 moindre d'environ 70 kD, telles que révélés après électrophorèse sur gel de de polyacrylamide en présence de SDS.

Le produit de la purification notamment mise en oeuvre par Schryvers est par définition arbitraire et pour les besoins de la présente demande de brevet, appelé récepteur de la transferrine et les polypeptides le constituant,
25 des sous-unités. Dans la suite du texte, les sous-unités de poids moléculaire élevé et de poids moléculaire moindre sont respectivement appelées Tbp1 et Tbp2.

30 Toutefois, le procédé de purification décrit par Schryvers et al ne peut pas être utilisé pour la production à grande échelle du récepteur de la transferrine. La préparation industrielle de ce récepteur sous forme purifiée passe nécessairement par une étape de production à l'aide d'un système d'expression hétérologue.

A cette fin, l'invention se propose de fournir les fragments d'ADN codant pour les sous-unités du récepteur de la transferrine de *N. meningitidis*.

5 D'autre part, depuis les travaux pionniers de Schryvers et al, on a découvert qu'il existait en fait au moins 2 types de souches qui diffèrent par la constitution de leurs récepteurs de la transferrine respectifs. Ceci a été mis en évidence en étudiant des extraits membranaires de plusieurs dizaines de souches de *N. meningitidis* d'origines variées. Ces extraits membranaires ont tout d'abord été soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en
10 présence de SDS, puis électrotransférés sur feuilles de nitrocellulose. Ces feuilles de nitrocellulose ont été incubées :

- 15 a) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* B16B6, aussi appelée IM2394 ;
- b) en présence d'un antisérum de lapin dirigé contre le récepteur de la transferrine purifié à partir de la souche *N. meningitidis* IM2169 ; ou
- 20 c) en présence de la transferrine humaine conjuguée à la peroxydase.

En ce qui concerne a) et b), la reconnaissance des sous-unités du récepteur de la transferrine est révélée par addition d'un anticorps anti-immunoglobulines de lapin couplé à la peroxydase, puis par addition du
25 substrat de cette enzyme.

Les tableaux I et II ci-dessous indiquent le profil de certaines souches représentatives tel qu'il apparait sur gel de polyacrylamide à 7,5 % après électrophorèse en présence de SDS ; les bandes sont caractérisées par leur
30 poids moléculaires apparents exprimés en kilodaltons (kD) :

| Souches | | | |
|--|--|--|----------------------------------|
| Tableau I | 2394 (B; 2a; P1.2; L2,3) 2228 (B; nd) 2170 (B; 2a; P1.2; L3) | 2234 (Y; nd) 2154 (C; nd) 2448 (B; nd) | 550 (C; 2a) 179 (C; 2a; P1.2) |
| Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394 | 93 68 | 93 69 | 99 69 |
| Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169 | 93 | 93 | 99 |
| Détection avec la transferrine peroxydase | 68 | 69 | 69 |

N.B. : Entre parenthèses sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

| | Souches | | | | | | | | |
|---|--------------------|----------------|----------------|---------------------|--------------------|--------------------|----------------|----------------|--------------------|
| Tableau II | 2169 (B:9:P1.9) | 1000 (B:nd) | 1604 (B:nd) | 132 (C:15:P1.16) | 1001 (A:4:P1.9) | 876 (B:19:P1.6) | 1951 (A:nd) | 2449 (B:nd) | 867 (B:2b:P1.2) |
| Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2394 | 96 | 98 | 98 | 98 | 98 | 96 | 94 | 94 | 93 |
| Détection avec l'antisérum anti-récepteur 2169 | 96 87 | 98 85 | 98 83 | 98 81 | 98 79 | 96 88 | 94 87 | 94 85 | 93 85 |
| Détection avec la transferrine- peroxydase | 87 | 85 | 83 | 81 | 79 | 88 | 87 | 85 | 85 |

N.B. : Entre parenthèse sont indiqués dans l'ordre le sérotype, le sous-type et l'immunotype.

Les résultats répertoriés dans les 2 premières lignes des tableaux montrent qu'il existe 2 types de souches :

5 Le premier type (Tableau I) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités dans les conditions expérimentales utilisées, sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur IM2394 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur IM2169.

10 Le second type (Tableau II) correspond à des souches qui possèdent un récepteur dont les 2 sous-unités dans les conditions expérimentales utilisées, sont reconnues par l'antisérum anti-récepteur IM2169 tandis que seule la sous-unité de haut poids moléculaire est reconnue par l'antisérum anti-récepteur IM2394.

15 En conséquence, il existe une diversité antigénique au niveau de la sous-unité de moindre poids moléculaire. Cette diversité est toutefois restreinte puisqu'elle se résout en 2 grands types, contrairement à ce qui est suggéré par Griffiths et al, FEMS Microbiol. Lett. (1990) 69 : 31.

20 En vertu de ces constatations, on pouvait supposer qu'un vaccin efficace à l'encontre de toutes les infections à *N. meningitidis* pourrait être constitué de manière suffisante, de la sous-unité de haut poids moléculaire, quelle que soit la souche d'origine du récepteur, puisque cette dernière est reconnue par
25 les 2 types d'antisérums. Toutefois, il semble que cela ne puisse être le cas dans la mesure où la sous-unité de haut poids moléculaire ne serait pas capable d'induire la production d'anticorps de type neutralisant. Seule la plus petite des 2 sous-unités du récepteur serait capable de remplir cette fonction. Puisque cette sous-unité de moindre poids moléculaire se caractérise par une
30 variation antigénique significative du premier type au deuxième type de souche, un seul type de récepteur de la transferrine ne devrait pas être suffisant pour vacciner contre toutes les infections à *N. meningitidis*. Par conséquent, un vaccin devra contenir au moins la sous-unité de moindre poids moléculaire de chacune des souches IM2394 et IM2169 ou de leurs équivalents respectifs et, de manière optionnelle, la sous-unité de haut poids
35 moléculaire d'au moins une souche de *N. meningitidis*.

C'est pourquoi l'invention fournit un fragment d'ADN isolé codant pour une protéine capable d'être reconnue par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169.

5

Un tel fragment d'ADN peut notamment comprendre une séquence nucléotidique codant pour une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée :

- 10 - dans l'identificateur de séquence (SEQ ID NO : 1) n° 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
- dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
- 15 - dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ; ou
- 20 - dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.

A titre indicatif, on précise qu'un fragment d'ADN selon l'invention peut en outre comprendre une séquence nucléotidique additionnelle codant pour n'importe quelle autre séquence d'acides aminés ; les deux séquences nucléotidiques considérées, formant un cadre ouvert de lecture de manière à coder pour une protéine hybride ou un précurseur.

25

De manière avantageuse, un fragment d'ADN selon l'invention peut être sélectionné parmi :

30

- i) Un premier fragment d'ADN isolé, ayant une séquence nucléotidique codant pour une protéine ayant une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579.

35

5 ii) Un deuxième fragment d'ADN isolé ayant une séquence nucléotidique codant pour une protéine ayant une séquence d'acides aminés à celle telle que montrée dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884.

10 iii) Un troisième fragment d'ADN isolé ayant une séquence nucléotidique codant pour une protéine ayant une séquence d'acides aminés à celle telle que montrée dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887.

15 iv) Un quatrième fragment d'ADN isolé ayant une séquence nucléotidique codant pour une protéine ayant une séquence d'acides aminés à celle telle que montrée dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.

20 Par "séquence d'acides aminés homologue", on entend une séquence présentant un degré d'homologie d'au moins 75 %, de manière avantageuse d'au moins 80 %, de manière préférée d'au moins 90 %, de manière tout à fait préférée de 100 %, avec la séquence d'acides aminés que l'on cite en référence. On notera que le terme "homologue" tel que défini inclut le cas particulier de l'identité.

25 Le degré d'homologie peut être aisément calculé en alignant les séquences de manière à obtenir le degré maximal d'homologie ; pour ce faire, il peut être nécessaire d'introduire artificiellement des emplacements vacants, comme cela est illustré dans la figure 7. Une fois que l'alignement optimal est réalisé, le degré d'homologie est établi en comptabilisant toutes
30 les positions dans lesquelles les acides aminés des deux séquences se retrouvent à l'identique, par rapport au nombre total de positions.

Il serait fastidieux de décrire des séquences homologues autrement que de manière générique, en raison du trop grand nombre de combinaisons. L'homme du métier connaît toutefois les règles générales qui permettent de remplacer un acide aminé par un autre sans abolir la fonction biologique ou immunologique d'une protéine.

Un fragment d'ADN isolé et tout à fait préféré a une séquence nucléotidique codant pour :

- 10 i) La sous-unité Tbp1 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est telle que montrée dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
- 15 ii) La sous-unité Tbp2 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
- 20 iii) La sous-unité Tbp1 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ; ou
- 25 iv) La sous-unité Tbp2 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691 .

30 Le récepteur de la transferrine étant une protéine membranaire, chacune de ses sous-unités est initialement produite sous forme d'un précurseur constitué d'un peptide signal associé en position N-terminale, à la forme mature.

C'est pourquoi l'invention a aussi pour objet un bloc d'ADN isolé codant pour un peptide signal dont la séquence d'acides aminés présente un degré d'homologie d'au moins 80 %, de manière préférée de 100 %, avec la séquence montrée dans :

- 5
- i) le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu alanine en position - 1 ;
- 10
- ii) le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu alanine en position - 1 ; ou
- iii) le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu méthionine en position - 20 et finissant avec le résidu alanine en position - 1.

15

Un fragment d'ADN selon l'invention peut être aussi sélectionné parmi un cinquième, sixième, septième et huitième fragments d'ADN codant respectivement pour un précurseur dont la séquence d'acides aminés est homologue à la séquence présentée dans le SEQ ID NO : 1, 2, 3 ou 4.

20

Par "fragment ou bloc d'ADN isolé" on entend un fragment ou bloc d'ADN d'origine génomique qui est i) inséré dans un vecteur viral ou plasmidique ou ii) placé sous le contrôle d'un promoteur qui lui est hétérologue.

25

De plus, le bloc d'ADN codant pour le peptide signal selon l'invention est, en outre, considéré comme isolé lorsque ce bloc d'ADN est associé à un fragment d'ADN codant pour une protéine hétérologue au peptide signal ; de manière à former un cadre de lecture ouvert codant pour un précurseur hybride.

30

L'invention concerne aussi une cassette d'expression qui comprend au moins un fragment d'ADN selon l'invention, placé sous le contrôle d'éléments capables d'assurer son expression dans une cellule-hôte appropriée.

Dans la cassette d'expression, le premier, deuxième, troisième ou quatrième fragment d'ADN selon l'invention peut être ou non associé à un bloc d'ADN codant pour un peptide signal hétérologue à la protéine codée par ledit fragment d'ADN, selon que l'on recherche ou non la sécrétion de la protéine. De préférence, cette sécrétion sera recherchée.

Les éléments indispensables à l'expression d'un fragment d'ADN selon l'invention sont un promoteur de transcription, des codons de début et de fin de traduction et, de manière optionnelle, un terminateur de transcription. Le promoteur peut être constitutif ou inductible. On indique que le fragment d'ADN codant pour la sous-unité Tbp2 de la souche IM2394 semble être toxique pour une cellule hétérologue, notamment pour *E. coli*. Dans ce cas là, il pourrait être préférable d'utiliser un promoteur inductible.

Des éléments tels qu'un bloc d'ADN codant pour un peptide signal hétérologue (région signal) ou un promoteur existent déjà en assez grand nombre et sont connus de l'homme du métier. Ses compétences générales lui permettront de choisir une région signal ou un promoteur particulier qui seront adaptés à la cellule-hôte dans laquelle il envisage l'expression.

Enfin, l'invention fournit un procédé de fabrication d'un peptide, d'un polypeptide ou d'une protéine capables d'être reconnus par un antisérum anti-récepteur de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169 qui comprend l'acte de cultiver une cellule-hôte comportant une cassette d'expression selon l'invention ; ainsi que le peptide, le polypeptide ou la protéine produit par ce procédé et les compositions vaccinales les contenant.

Aux fins du procédé selon l'invention, la cellule-hôte peut être une cellule de mammifère, une bactérie ou une levure ; ces deux dernières étant préférées. Là aussi, le choix d'une lignée particulière est à la portée de l'homme du métier.

Afin de déterminer l'objet de la présente invention, on précise que les souches de *N. meningitidis* IM2394 et IM2169 sont publiquement disponibles auprès de la Collection Nationale de Culture des Microorganismes (CNCM), Institut Pasteur, 25 rue du Dr Roux 75015 Paris sous les numéros d'enregistrement respectifs LNP N 1511 et LNP N 1520.

Un antisérum spécifique du récepteur de la transferrine de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169 peut être obtenu tel que décrit dans les exemples ci-après.

L'invention est décrite plus en détails dans les exemples ci-après et par référence aux Figures 1 à 8.

La Figure 1 représente la structure du phage lambda ZAP II et schématise la méthodologie de clonage y afférent. Lambda ZAP II est un vecteur d'insertion équipé de sites de clonage multiples localisés dans la partie plasmidique (pBluescript SK). Cette partie plasmidique peut être excisée *in vivo* par co-infection avec un phage-helper et convertie en vecteur plasmidique. Si une séquence codante est fusionnée en phase à lacZ ou si un fragment d'ADN cloné comporte un promoteur fonctionnel dans *E. coli*, il peut y avoir production d'une protéine d'intérêt qui pourra être détectée à l'aide d'anticorps spécifiques.

La Figure 2 présente la structure du plasmide pTG1265. pTG1265 dérive du plasmide pGB2 (Churchward et al, Gene (1984) 31 : 165) comme suit : pGB2 est digéré par *EcoRI* et *HindIII*, traité à la polymérase Klenow puis ligué au fragment *SspI* - *PvuII* de 1 kb issu de pTTT3 184 (Mead et al, Protein Engineering (1986) 1 : 67 ; Pharmacia) qui comporte fl-ori, la séquence lacZ, les promoteurs T3 et T7 ainsi que des sites multiples de clonage.

La Figure 3 présente la carte génomique de la région d'ADN de la souche IM2394 comportant les séquences codant pour Tbp1 et Tbp2 ainsi que les différents fragments qui ont été clonés. B = *BamHI* ; E = *EcoRI* ; H = *HincII* ; R = *EcoRV* ; X = *XbaI* ; C = *ClaI*.

La Figure 4 présente la carte génomique de la région d'ADN de la souche IM2169 comportant les séquences codant pour Tbp1 et Tbp2 ainsi que les différents fragments qui ont été clonés. C = *ClaI* ; H = *HincII* ; M = *MluI* ; X = *XbaI* ; ? = position imprécise.

5

La Figure 5 présente la structure du plasmide para13. para13 est un plasmide capable de se répliquer dans *E. coli* qui comporte le promoteur de l'opéron arabinose BAD (ParaB) de *Salmonella typhimurium* (modifié au niveau de la TATA box), ainsi que le gène AraC. En aval du promoteur ParaB se trouve des sites multiples d'insertion. La série des plasmides para est décrite par Cagnon et al, Prot. Eng. (1991) 4 : 843.

10

La Figure 6 représente la méthodologie qui a été mise en oeuvre pour construire le vecteur d'expression pTG3786.

15

La Figure 7 compare les séquences d'acides aminés prédites des sous-unités Top1 des souches IM2394 et IM2169. Le degré d'homologie peut être estimé à environ 76 %.

20

La Figure 8 compare les séquences d'acides aminés prédites des sous-unités Tbp2 des souches IM2394 et IM2169. Le degré d'homologie peut être estimé à environ 47 %.

25

La Figure 9 représente la méthodologie qui a été mise en oeuvre pour construire le vecteur d'expression pTG3779.

EXEMPLE 1: Clonage des fragments d'ADN codant pour les sous-unités Tbp1 et Tbp2 du récepteur de la transferrine de la souche IM2394

5 1A - Culture de la souche et purification du récepteur de la transferrine

Un lyophilisat de la souche *N. meningitidis* IM2394 est repris dans environ 1 ml de bouillon Muller-Hinton (BMH, Difco). La suspension bactérienne est ensuite étalée sur le milieu solide Muller-Hinton contenant
10 du sang cuit (5 %).

Après 24 hr d'incubation à 37°C dans une atmosphère contenant 10 % de CO₂, la nappe bactérienne est recueillie pour ensemer 150 ml de BMH pH 7.2, répartis en 3 erlens de 250 ml. L'incubation est poursuivie
15 pendant 3 hr à 37°C sous agitation. Chacune des 3 cultures ainsi réalisées permet d'ensemencer 400 ml de BMH pH 7,2 supplémenté avec 30 µm de Ethylènediamine - Di (O-Hydroxyphenyl - acetic acid (EDDA, Sigma), qui est un agent chélatant du fer sous forme libre.

20 Après 16 hr de culture à 37°C sous agitation, les cultures sont contrôlées pour leur pureté par observation au microscope après une coloration de Gram. La suspension est centrifugée, le culot contenant les germes est pesé et conservé à -20°C.

25 La purification est mise en oeuvre essentiellement selon la méthode décrite par Schryvers et al (supra), comme suit :

Le culot bactérien est décongelé, puis remis en suspension dans 200 ml de tampon Tris HCl 50 mM, pH 8.0 (tampon A). La suspension est
30 centrifugée pendant 20 min à 15 000 xg à 4°C. Le culot est récupéré, puis remis en suspension dans du tampon A à la concentration finale de 150 g/l. Des fractions de 150 ml sont traitées pendant 8 min à 800 bars dans un lyseur de cellules travaillant sous haute pression (Rannie, modèle 8.30H). Le lysat cellulaire ainsi obtenu est centrifugé pendant 15 min à 4°C à 15 000 xg. Le
35 surnageant est récupéré, puis centrifugé pendant 75 min à 4°C à 200 000 xg. Après élimination du surnageant, le culot est repris dans du tampon A et

après dosage de protéines selon Lowry, la concentration de la suspension est ajustée à 5 mg/ml.

5 A 1,4 ml de la suspension de membranes on ajoute 1,75 mg de transferrine humaine biotinylée selon le procédé décrit par Schryvers. La concentration finale de la fraction membranaire est de 4 mg/ml. Le mélange est incubé 1 heure à 37°C puis centrifugé à 100 000 xg pendant 75 minutes à 4°C. Le culot de membranes est repris par le tampon A contenant du NaCl 0,1M et incubé pendant 60 minutes à température ambiante.

10 Après solubilisation, on ajoute à cette suspension un certain volume de N-Lauroyl Sarkosine à 30 % (p/v) et d'EDTA 500 mM de façon que les concentrations finales en Sarkosyl et EDTA soient de 0,5 % et 5 mM respectivement. Après une incubation de 15 minutes à 37°C sous agitation,
15 on ajoute 1 ml de résine strepavidine-agarose (Pierce) préalablement lavée en tampon A. La suspension est incubée 15 minutes à température ambiante puis centrifugée à 1 000 xg pendant 10 minutes. La résine est ensuite conditionnée dans une colonne et l'éluat direct est éliminé.

20 La résine est lavée par 3 volumes de colonne de tampon Tris-HCl 50 mM pH 8,0 contenant NaCl 1M, EDTA 10 mM Sarkosyl 0,5 % (tampon B) puis par un volume de colonne de tampon B contenant de la guanidine-HCl 750 mM. Le récepteur de la transferrine est ensuite élué par le tampon B contenant de la guanidine-HCl 2M. L'éluat est collecté en fractions, dans des
25 tubes contenant un volume identique de Tris HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 1M. La densité optique à 280 nm de l'éluat est mesurée en sortie de colonne à l'aide d'un détecteur UV.

30 Les fractions correspondant au pic d'élution sont recueillies, dialysées contre du tampon phosphate 10 mM, pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % et lyophilisées. Le lyophilisat est repris dans de l'eau à une concentration 10 fois supérieure. La solution est dialysée une seconde fois contre du tampon phosphate 50 mM pH 8,0 contenant du Sarkosyl 0,05 % (tampon C) puis la
35 solution est filtrée sur une membrane de porosité 0,22 µm.

Le contenu en protéines est déterminé et ajusté à 1 mg/ml par

addition de tampon C, sous conditions aseptiques. Cette préparation est conservée à -70°C .

1B - Préparation d'un antisérum spécifique du récepteur de la transferrine

5 Des lapins néo-zélandais albinos reçoivent par voie sous-cutanée et intramusculaire 100 μg du récepteur IM2394 en présence d'adjuvant complet de Freund. 21 jours et 42 jours après la première injection, les lapins reçoivent à nouveau 100 μg du récepteur purifié mais ces fois-ci en présence
10 d'adjuvant incomplet de Freund. 15 jours après la dernière injection, le sérum des animaux est prélevé, puis décomplémenté et filtré sur une membrane de porosité 0,45 μm . Le filtrat est par la suite épuisé par contact avec la souche IM2394 qui pour se faire, a été cultivée au préalable en présence de fer sous forme libre (dans ces conditions, la synthèse du
15 récepteur de la transferrine est réprimée). Les modalités de contact sont comme suit : 10 ml du filtrat sont ajoutés à 10^{10} cfu (unités formant des colonies) d'une culture de la souche IM2394. L'adsorption est poursuivie une nuit à 4°C , sous agitation. Les bactéries sont ensuite éliminées par centrifugation. Le surnageant est récupéré puis soumis à nouveau à 2
20 opérations d'adsorption successives comme précédemment décrit.

1C - Détermination des séquences peptidiques permettant l'identification des fragments d'ADN.

25 Des fractions aliquotes du matériel obtenu en 1A sont séchées puis resolubilisées dans le tampon de Laemmli deux fois concentré (Tris 65mM, SDS 3 %, glycérol 10 %, 2-mercaptoéthanol 5 %). On ajoute un volume d'eau équivalent.

30 Après sonication, le matériel est chauffé à 90°C pendant 2 minutes, puis soumis à une électrophorèse sur gel de polyacrylamide. Les sous-unités ainsi séparées sont transférées sur membrane PVDF (Immobilon, Millipore) pendant 16 heures à 400 mA en tampon Tris borate 50 mM, pH 8,3. Les sous-unités électrotransférées sont colorées à l'amido black et les bandes
35 correspondant à Tbp1 et Tbp2 sont récupérées et soumises au microséquençage de l'extrémité N-terminale.

Ceci est répété plusieurs fois pour établir les séquences consensus N-terminales suivantes :

5 Tbp1 IM2394 : EXVQAEQAQEKQLDTIQV
 Tbp2 IM2394 : XLXXXXSFDLDSVEXVQXMX

(X = acide aminé non-déterminé).

10 Afin de séquencer des régions internes de Tbp2, la protéine sur membrane PVDF est soumise à digestion par la trypsine en tampon Tris 0,1 M pH 8,2. Après 4 heures de réaction à 37°C, les peptides sont extraits par de l'acide formique 70 % puis par de l'acide trifluoroacétique (TFA) 0,1 %. Ces peptides sont ensuite séparés par HPLC.

15 Pour Tbp2 IM2394, les séquences internes qui ont été établies sont les suivantes :

 S1122 : NNIVLFGPDGYLYYK
 S1125 : YTIQA
 Sⁿ770 : DGENAAGPATEXVIDAYR
20 Sⁿ766 : XQIDSFGDVK
 S1126 : AAFXXXI
 Sⁿ769 : XNXXXMFLQGVR
 Sⁿ771 : TPVSDVAAR
 Sⁿ767 : XSPAFT
25 Sⁿ762 : NAIEMGGSFXFPGNAPEG(K)
 S1128 : XQPESQQDVSENX

1D - Préparation de l'ADN génomique.

30 Le culot bactérien obtenu en 1A est resuspendu dans environ 25 ml de solution A (Tris HCl 25 mM, pH 8 contenant 50 mM de glucose et 10 mM d'EDTA) additionnée de 10 mg de protéinase K. Le mélange est laissé 10 minutes à température ambiante.

Puis on ajoute 12,5 ml de solution A contenant 10 mg de lysosyme. Une nouvelle fois, le mélange est laissé 10 minutes à température ambiante. On complète alors par 0,5 ml de sarkosyl 10 %. Le mélange est incubé 10 minutes à +4°C.

5

On ajoute ensuite 2 mg de RNase et on laisse l'incubation se poursuivre 90 minutes à 37°C. L'ADN est purifié par quatre extractions phénoliques successives. L'ADN présent dans la dernière phase aqueuse est précipité par l'éthanol. L'ADN de haut poids moléculaire est obtenu par

10

1E - Clonage.

Une première banque d'ADN a été réalisée dans le vecteur lambda ZAP (Figure 1), comme suit :

15

Une préparation d'ADN génomique a été fragmentée aux ultrasons. Les extrémités des fragments ainsi obtenus ont été rendues franches par traitement à la T₄ polymérase. Les fragments ont été méthylés. Après

20

méthylation, les fragments ont été liés à des adaptateurs *EcoRI*, traités par *EcoRI* puis insérés dans le site *EcoRI* du phage lambda ZAP II (Stratagène).

25

30

La souche *E. coli* XL1-Blue (Stratagène) a été infectée avec la banque d'ADN ainsi préparée. Les plages de lyse blanches (présence de phages recombinants) ont été testées à l'aide d'un antisérum spécifique du récepteur de la transferrine de la souche IM2394 préparé tel que décrit en 1B. Ceci a permis d'identifier deux clones lambda ZAP II. Les plasmides pBluescript contenus dans ces clones ont été excisés par co-infection avec le phage-"helper" et ont été appelés pBMT1 et pBMT2.

35

Les plasmides pBMT1 et pBMT2 contiennent chacun un fragment *EcoRI* - *EcoRI* respectivement de 3,8 kb et 1,3 kb. Ils sont présentés dans la Figure 3.

Le séquençage de l'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT1 a été mis en oeuvre selon la méthode de shotgun (Bankier et Barrell, Biochemistry (1983))

B5 : 508), comme suit :

5 L'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT1 a été purifié puis fragmenté aux ultra-sons. Les extrémités des fragments ainsi obtenus ont été rendues franches par traitement à la T₄ polymérase. Les fragments ainsi traités ont été introduits dans un site du phage M13TG131 (décrit dans Kieny et al, Gene (1983) 26 : 91). Environ 200 clones issus de cette préparation ont été séquencés. L'analyse de ces séquences par ordinateur a permis de reconstituer la séquence complète de l'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT1.

10

La séquence codant pour l'extrémité N-terminale de Tbp1 a été localisée comme le montre la Figure 3. Compte tenu de la masse moléculaire de Tbp1, il était clair que cet insert ne comportait pas le fragment d'ADN complet codant pour Tbp1. En amont de l'extrémité 5' du gène *tbp1*, on a mis en évidence un cadre de lecture ouvert mais il n'a pas été possible d'identifier clairement une région codant pour l'extrémité N-terminale du gène *tbp2*.

15

20 Le microséquençage de régions internes de Tbp2 a donc été entrepris comme reporté précédemment en 1C. Les séquences internes qui étaient localisées vers l'extrémité C-terminale, correspondaient bien à la partie 3' du cadre de lecture ouvert en amont de *tbp1*.

25

D'autre part, l'ADN génomique de la souche IM2394, préalablement digéré par *HincII* a été analysé par Southern blot à l'aide d'une sonde d'ADN radioactive correspondant à la zone *HincII* - *HincII* de 1,5 kb de l'insert de 3,8 kb de pBMT1 ; deux bandes ont été ainsi révélées. Ceci a permis de démontrer que l'insert porté par pBMT1 résultait d'un assemblage artéfactuel de séquences issues de deux loci distincts. La

30

La banque d'ADN génomique en lambda ZAP précédemment décrite a été criblée de nouveau ; cette fois-ci en utilisant l'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT2 comme sonde. 29 candidats ont été retenus parmi environ 200 000 plages testées. Seul le plasmide dérivé pTG2749 semblait posséder un insert nouveau par rapport à pBMT1 et pBMT2. L'insert de pTG2749 est

35

tel que représenté dans la Figure 3. La région de l'insert en amont du site *EcoRV* (région *EcoRV* - *EcoRI*) a été sous-clonée dans M13TG131 et séquencée par la méthode de Sanger et al, PNAS (1977) 74 : 5463 à l'aide de primers synthétiques. La séquence correspondant à l'extrémité N-terminale de Tbp2 a été ainsi retrouvée.

La séquence du fragment d'ADN codant pour Tbp2 de la souche IM2394 est présentée dans le SEQ ID NO : 1 ainsi que la séquence d'acides aminés correspondante.

Juste en amont de la séquence codant pour Tbp2 mature, l'insert de pTG2749 comporte une région génomique distincte issue d'un autre locus. La aussi, il s'agit d'une artéfact de clonage analogue à celui mis en évidence dans le cas de pBMT1.

Compte tenu des réarrangements observés et de l'absence de séquences 3' de *tbp1* et 5' de *tbp2*, la banque d'ADN génomique construite en lambda ZAP a été jugée inadaptée pour la poursuite du clonage.

Une deuxième banque d'ADN génomique a donc été construite dans un plasmide à faible nombre de copies, comme suit : une préparation d'ADN génomique a été partiellement digérée par *Sau3A*. Des fragments d'ADN d'environ 4 à 6 kb ont été purifiés après fractionnement en gradient de sucrose et insérés dans le site *BamHI* du plasmide pTG1265. Cette préparation plasmidique a servi à transformer la souche d'*E. coli* 5K. On a estimé que cette banque contenait environ 18 000 clones indépendants.

Environ 50 000 clones de la deuxième banque ont été testés à l'aide d'une sonde radioactive correspondant à l'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT2. Un seul clone a été révélé ; soit le plasmide pTG2759 qui possède un insert de 1,8 kb. La taille de cette insert a été jugée insuffisante pour contenir le gène complet codant pour Tbp1.

Une troisième banque d'ADN a été construite selon la méthode décrite au paragraphe précédent à l'exception de la souche d'*E. coli* 5K qui a été remplacée par la souche d'*E. coli* SURE (Stratagène). On a estimé que

cette banque contenait environ 60 000 clones indépendants.

5 Environ 70 000 clones de la troisième banque d'ADN ont été testés à l'aide d'une sonde radioactive correspondant au fragment *MluI* - *HincII* de 2,4 kb issu de l'insert de pTG2754 décrit dans l'Exemple 2 ci-après et représenté dans la Figure 4. Deux clones ont été révélés, soient les plasmides pTG2780 et pTG2781, représentés dans la Figure 3.

10 La séquence des inserts de pTG2780 et pTG2781 a été établie selon la méthode de Sanger. Elle est présentée dans le SEQ ID NO : 2 ainsi que la séquence d'acides aminés correspondante.

15 Une quatrième banque a été construite. Le DNA génomique a été digéré par *Sau3A* et une fraction contenant des fragments d'environ 7 kb a été purifiée sur gradient de sucrose. Cette fraction contenait un fragment correspondant au locus *tbp1,2* car elle était reconnue par une sonde d'ADN spécifique de *tbp2*. Après digestion par *EcoRV* et *XbaI* et ligation à pTG1265 digéré par *SmaI* et *XbaI*, *E. coli* 5K a été transformée. Un criblage des clones à l'aide d'une sonde spécifique de *tbp2* a été réalisé. Parmi une série de clones positifs, le plasmide pTG3791 a été étudié en particulier et s'est avéré contenir des séquences 5' *tbp2* incluant la séquence codant pour le peptide signal putatif de Tbp2.

25 EXEMPLE 2: Clonage des fragments d'ADN codant pour les sous-unités Tbp1 et Tbp2 du récepteur de la transferrine de la souche IM2169.

2A - La culture de la souche IM2169 et la purification du récepteur de la transferrine ont été effectuées dans des conditions identiques à celles décrites dans l'Exemple 1A.

30 2B - La préparation d'un antisérum anti-récepteur de la souche IM2169 a été réalisée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1B.

35 2C - Les séquences peptidiques permettant l'identification des fragments d'ADN ont été déterminées selon la méthode reportée dans l'Exemple 1C.

Les microséquences qui ont été établies sont les suivantes.

Séquence consensus de l'extrémité N-terminale de Tbp1 :
ENVQAGQAQEKQLXXIQVX

5

Séquences des peptides internes de Tbp1 :

S1031 : XLS(E,W)NAGXVLXPADX

S1032 : QLDTIQVK

S1033 : TAGSSGAINEIEYENXX

10

S1034 : YVTWENVDXXXXXXX

Séquence consensus de l'extrémité N-terminale de Tbp2 :
SLVXAXSFDLXSV

15

Séquences des peptides internes de Tbp2 :

S1037 : XXDNLSNAX

S1035 : XGDDGYIFYXGEKPY

S1036 : XQGXYGFAMX

S1040 : XQATGHENFQYVYSGXFFK

20

2D - La préparation de l'ADN génomique de la souche IM2169 a été réalisée selon le protocole décrit dans l'Exemple 1D.

2E - Clonage

25

Une première banque d'ADN génomique (fragments d'ADN *Sau3A* partiel ; pTG1265 ; *E. coli* 5K) a été construite comme précédemment décrit dans l'Exemple 1. On a estimé que cette banque contenait environ 40 000 clones indépendants, dont environ 70 % possédaient un insert de 4-6 kb.

30

130 000 clones de cette banque ont été testés à l'aide d'une sonde radioactive correspondant à l'insert *EcoRI* - *EcoRI* de pBMT2. 42 clones ont été analysés, parmi lesquels 2 ont été retenus : les plasmides pTG2753 et pTG2754 qui sont tels que montrés dans la Figure 4. Les analyses en Southern blot ont montré que les cartes de restriction des inserts de

35

pTG2753 et pTG2754 correspondaient à la carte de restriction de l'ADN

génomique.

La détermination des séquences nucléotidiques et la recherche des régions codant pour les extrémités N-terminales et les régions internes ont
5 démontré que :

- l'insert de 1,9 kb de pTG2753 contient la partie 3' du gène *tbp2* et la partie 5' du gène *tbp1* ; et
- 10 - l'insert de pTG2754 contient la partie 3' du gène *tbp2* et les parties 5' et 3' du gène *tbp1*, en rupture de phase.

Cette première banque n'a donc pas permis de cloner des fragments d'ADN complets codant pour Tbp1 ou Tbp2.
15

Une deuxième banque génomique a été construite comme précédemment mais à partir d'ADN génomique digéré par *XbaI*. Les fragments d'ADN ont été purifiés après fractionnement en gradient de sucrose. Chaque fraction (d'environ 500 μ l) a été testée par Southern blot
20 avec une sonde radioactive correspondant à l'extrémité 3' de *tbp1* (fragment de l'insert de pTG2754). La fraction présentant une réaction d'hybridation et contenant des fragments d'environ 6 kb a été clonée dans pTG1265. La souche *E. coli* 5K a été transformée.

25 Environ 2 400 clones de cette banque ont été testés à l'aide d'une sonde radioactive correspondant au fragment *HincII* - *MluI* de 0,6 kb issu de pTG2754. Cinq clones ont été caractérisés, parmi lesquels 2 ont été retenus : soient pTG3720 et pTG3721, tels que montrés dans la Figure 4, qui contiennent tous deux les gènes *tbp1* et *tbp2*.

30 Afin de compléter la séquence nucléotidique codant pour Tbp1, l'insert de pTG3720 a été séquencé dans la région où se situait la rupture de phase découverte dans l'insert de pTG2754. Ce séquençage a permis de mettre en évidence que la rupture de phase de l'insert de pTG2754 était due à une
35 délétion de 22 bp. La séquence complète du fragment d'ADN est telle que montrée dans le SEQ ID NO : 3.

Le séquençage de l'insert de pTG3720 a été poursuivi pour établir la séquence de *tbp2*. Celle-ci a bien été identifiée ; mais là aussi une rupture de phase a été constatée.

5 Finalement la séquence de *tbp2* a été déterminée à partir du plasmide pTG3721. Elle est telle que montrée dans le SEQ ID NO : 4.

EXEMPLE 3 : Expression du fragment d'ADN codant pour la sous-unité Tbp2 de la souche IM2394.

10

3A. Construction du vecteur d'expression pTG3786.

Le site *SphI* du plasmide para13 (Figure 5 ; Cagnon et al, Prot. Eng. (1991) 4 : 843) a été détruit par traitement à la polymérase Klenow, pour
15 donner le plasmide pTG3704. pTG3704 a été linéarisé par coupure *NcoI*, traité à la polymérase Klenow pour rendre les extrémités franches, puis digéré par *HindIII*.

20 D'autre part, on a synthétisé les oligonucléotides OTG4015 et OTG4016 que l'on a appariés.

OTG4015 : 5' AAATACCTATTGCCTACGGCAGCCGCTGGACTGTTATTACT
CGCTGCCCAACCAGCGATGGCATGCTTTCCCACGCGTTTTCCCA 3'

25 OTG4016 : 5' AGCTTGGGAAAACGCGTGGGAAAGCATGCCATCGCTGGTTGGGCA
GCGAGTAATAACAGTCCAGCGGCTGCCGTAGGCAATAGGTATTT 3'

30 Le fragment d'ADN double brin OTG4015/OTG4016 a été inséré dans para13 traité comme précédemment décrit, pour donner le plasmide pTG3717 dans lequel on avait reconstitué la séquence codant pour la partie N-terminale du précurseur de la protéine PelB d'*Erwinia carotovora* (Lei et al, J. Bact. (1987) 169 : 4379) ; Soit :

35 ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA CTG
Met Lys Tyr Leu Leu Pro Thr Ala Ala Ala Gly Leu

SphI

TTA TTA CTC GCT GCC CAA CCA GCG ATG GCA TGCTTT
Leu Leu Leu Ala Ala Gln Pro Ala Met Ala

5 *MluI* *HindIII*
CCCACGCGTTTCCCA AGCTT.....

(en souligné, apparaissent les extrémités de pTG3704)

10 A partir du plasmide pTG2749, on a généré par PCR à l'aide des amorces OTG4011 et OTG 4012, un fragment incluant la région codant pour la partie N-terminale de Tbp2, jusqu'au site *MluI* interne, tel que montré dans la Figure 6.

15 OTG4011 :
 BamHI *SphI*
5' AAAAAGGATCC/GCA TGC CTG GGT GGC GGC GGC AGT TTC 3'
 Cys Leu Gly

20 OTG4012 :
 BamHI *MluI*
5' AAAAGGATCCG AAT GGT GTA ACG CGT AGT TTT TAT 3'

25 Le fragment généré par PCR a été digéré par *BamHI*, puis inséré dans le site *BamHI* du phage M13TG131, pour donner M13TG3724. La séquence de ce fragment a été vérifiée par séquençage.

30 A partir de M13TG3724, on a récupéré la région codant pour la partie N-terminale de Tbp2 sous forme d'un fragment *SphI* - *MluI* que l'on insert dans pTG3717 préalablement digéré par *SphI* et *MluI*, pour donner le plasmide pTG3743.

35 A partir du plasmide pBMT1, on a récupéré la région codant pour la partie C-terminale de Tbp2 sous forme d'un fragment *MluI* - *BanI* dont l'extrémité cohésive *BanI* avait été rendue franche par traitement à la polymérase Klenow. On a inséré ce fragment dans pTG3743 préalablement

digéré par *HindIII*, traité à la polymérase Klenow et finalement digéré par *MluI*. On obtient ainsi le plasmide pTG3786.

3B. Production de la sous-unité Tbp2.

5

E. coli MC1061 (Casadaban & Cohen, J. Mol. Biol. (1980) 138 : 179) est transformée par pTG3786 puis mise en culture à 37°C, en milieu LB supplémenté avec 2 g/l de glycérol. A la culture est en phase exponentielle, on ajoute 0,2 g/l d'arabinose. L'incubation a été poursuivie durant 6 hr supplémentaires. L'expression a été observée moins d'une heure après l'addition d'arabinose.

10

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide d'un échantillon du lysat cellulaire total a mis en évidence la présence d'une protéine d'environ 70 kD qui est capable de fixer la transferrine humaine marquée à la peroxydase.

15

EXEMPLE 4 : Expression du fragment d'ADN codant pour la sous-unité *tbp1* de la souche IM2169.

20 4A. Construction du vecteur d'expression pTG37796.

Un fragment synthétique constitué des oligonucléotides OTG4038 et OTG4039 préalablement appariés, a été inséré dans le plasmide pTG3704 digéré par *NcoI* et *HindIII*, générant ainsi le plasmide pTG3756.

25

OTG4038 :

5' CATGGCTGCAGGRACCACGCGTGAATTCCCCGGGTCTAGA 3'

OTG4039 :

30 5' AGCTTCTAGACCCGGGGAATTCACGCGTGGTACCTGCAGC 3'

A partir du plasmide pTG2754, on a généré par PCR à l'aide des amorces OTG4037 et OTG4014 un fragment incluant la région codant pour l'extrémité N-terminale du précurseur de Tbp1 jusqu'au site *MluI*.

OTG4037 :

5' TTTCCCGGATCCGC ATG CAA CAG CAA CAT TTG TTC CGA TTA 3

*Bam*HI *Sph*I

Met Gln Gln Gln...

5

OTG4014 :

5' AAAAGGATCCGGGGTCGTAACGCGTCAGGTCGCGG 3'

*Bam*HI

*Mlu*I

10

Ce fragment PCR a été digéré par *Bam*HI et cloné dans le site *Bam*HI de M13TG131 pour générer M13TG3738. La séquence de ce fragment a été vérifiée.

15

M13TG3738 a ensuite été linéarisé par *Sph*I, traité à la T4 DNA polymérase pour rendre les extrémités franches, puis digéré par *Mlu*I afin d'isoler le fragment porteur de la région codant pour l'extrémité N-terminale du précurseur de Tbp1.

20

Ce fragment a été inséré dans pTG3756 digéré par *Nco*I, traité à la T4 DNA polymérase puis digéré par *Mlu*I, pour générer le plasmide pTG3778. La séquence de la jonction *Nco*I/*Sph*I⁺ a été vérifiée.

25

Le fragment *Mlu*I - *Xba*I de pTG3720 codant pour la majeure partie de Tbp1 (3'tbp1) a été inséré dans le plasmide pTG3778. Le plasmide final ainsi obtenu est le plasmide pTG3779.

4B. Production de la sous-unité Tbp1.

30

E. coli MC1061 a été transformé par pTG3779 puis mise en culture à 37°C en milieu LB. A la culture en phase exponentielle, on a ajouté 0,2 g/l d'arabinose. L'incubation a été poursuivie durant 4 heures.

35

L'électrophorèse sur gel d'acrylamide d'un échantillon du lysat cellulaire total a mis en évidence la présence d'une protéine d'environ 100 Kd qui est capable de fixer la transferrine humaine marquée à la peroxydase.

SEQ ID NO : 1

Objet : Séquence de l'ADN génomique de la souche de *N. meningitidis* IM2394 codant pour la sous unité Tbp2 et séquence protéique déduite. En gras sont indiqués le peptide signal et le site *MluI*

[illegible]

| | |
|--|------|
| TAT AAA GGG AAA GAA CCT TCC AAG GAG CTG CCA TCG GAA AAG ATA Tyr Lys Gly Lys Glu Pro Ser Lys Glu Leu Pro Ser Glu Lys Ile 155 160 165 | 555 |
| ACT TAT AAA GGT ACT TGG GAT TAT GTT ACT GAT GCT ATG GAA AAA Thr Tyr Lys Gly Thr Trp Asp Tyr Val Thr Asp Ala Met Glu Lys 170 175 180 | 600 |
| CAA AGG TTT GAA GGA TTG GGT AGT GCA GCA GGA GGA GAT AAA TCG Gln Arg Phe Glu Gly Leu Gly Ser Ala Ala Gly Gly Asp Lys Ser 185 190 195 | 645 |
| GGG GCG TTG TCT GCA TTA GAA GAA GGG GTA TTG CGT AAT CAG GCA Gly Ala Leu Ser Ala Leu Glu Glu Gly Val Leu Arg Asn Gln Ala 200 205 210 | 690 |
| GAG GCA TCA TCC GGT CAT ACC GAT TTT GGT ATG ACT AGT GAG TTT Glu Ala Ser Ser Gly His Thr Asp Phe Gly Met Thr Ser Glu Phe 215 220 225 | 735 |
| GAG GTT GAT TTT TCT GAT AAA ACA ATA AAG GGC ACA CTT TAT CGT Glu Val Asp Phe Ser Asp Lys Thr Ile Lys Gly Thr Leu Tyr Arg 230 235 240 | 780 |
| AAC AAC CGT ATT ACT CAA AAT AAT AGT GAA AAC AAA CAA ATA AAA Asn Asn Arg Ile Thr Gln Asn Asn Ser Glu Asn Lys Gln Ile Lys 245 250 255 | 825 |
| ACT ACG CGT TAC ACC ATT CAA GCA ACT CTT CAC GGC AAC CGT TTC Thr Thr Arg Tyr Thr Ile Gln Ala Thr Leu His Gly Asn Arg Phe 260 265 270 | 870 |
| AAA GGT AAG GCG TTG GCG GCA GAT AAA GGT GCA ACA AAT GGA AGT Lys Gly Lys Ala Leu Ala Ala Asp Lys Gly Ala Thr Asn Gly Ser 275- 280 285 | 915 |
| CAT CCC TTT ATT TCC GAC TCC GAC AGT TTG GAA GGC GGA TTT TAC His Pro Phe Ile Ser Asp Ser Asp Ser Leu Glu Gly Gly Phe Tyr 290 295 300 | 960 |
| GGG CCG AAA GGC GAG GAA CTT GCC GGT AAA TTC TTG AGC AAC GAC Gly Pro Lys Gly Glu Glu Leu Ala Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp 305 310 315 | 1005 |
| AAC AAA GTT GCA GCG GTG TTT GGT GCG AAG CAG AAA GAT AAG AAG Asn Lys Val Ala Ala Val Phe Gly Ala Lys Gln Lys Asp Lys Lys 320 325 330 | 1050 |
| GAT GGG GAA AAC GCG GCA GGG CCT GCA ACG GAA ACC GTG ATA GAT Asp Gly Glu Asn Ala Ala Gly Pro Ala Thr Glu Thr Val Ile Asp 335 340 345 | 1095 |
| GCA TAC CGT ATT ACC GGC GAG GAG TTT AAG AAA GAG CAA ATA GAC Ala Tyr Arg Ile Thr Gly Glu Glu Phe Lys Lys Glu Gln Ile Asp 350 355 360 | 1140 |
| AGT TTT GGA GAT GTG AAA AAG CTG CTG GTT GAC GGA GTG GAG CTT Ser Phe Gly Asp Val Lys Lys Leu Leu Val Asp Gly Val Glu Leu 365 370 375 | 1185 |
| TCA CTG CTG CCG TCT GAG GGC AAT AAG GCG GCA TTT CAG CAC GAG Ser Leu Leu Pro Ser Glu Gly Asn Lys Ala Ala Phe Gln His Glu 380 385 390 | 1230 |

- 30 -

| | |
|---|------|
| ATT GAG CAA AAC GGC GTG AAG GCA ACG GTG TGT TGT TCC AAC TTG | 1275 |
| Ile Glu Gln Asn Gly Val Lys Ala Thr Val Cys Cys Ser Asn Leu | |
| 395 400 405 | |
| GAT TAC ATG AGT TTT GGG AAG CTG TCA AAA GAA AAT AAA GAC GAT | 1320 |
| Asp Tyr Met Ser Phe Gly Lys Leu Ser Lys Gln Asn Lys Asp Asp | |
| 410 415 420 | |
| ATG TTC CTG CAA GGT GTC CGC ACT CCA GTA TCC GAT GTG GCG GCA | 1365 |
| Met Phe Leu Gln Gly Val Arg Thr Pro Val Ser Asp Val Ala Ala | |
| 425 430 435 | |
| AGG ACG GAG GCA AAC GCC AAA TAT CGC GGT ACT TGG TAC GGA TAT | 1410 |
| Arg Thr Glu Ala Lys Tyr Arg Gly Thr Gly Thr Trp Tyr Gly Tyr | |
| 440 445 450 | |
| ATT GCC AAC GGC ACA AGC TGG AGC GGC GAA GCC TCC AAT CAG GAA | 1455 |
| Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Glu Ala Ser Asn Gln Glu | |
| 455 460 465 | |
| GGT GGT AAT AGG GCA GAG TTT GAC GTG GAT TTT TCC ACT AAA AAA | 1500 |
| Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Asp Val Asp Phe Ser Thr Lys Lys | |
| 470 475 480 | |
| ATC AGT GGC ACA CTG ACG GCA AAA GAC CGT ACG TCT CCT GCG TTT | 1545 |
| Ile Ser Gly Thr Leu Thr Ala Lys Asp Arg Thr Ser Pro Ala Phe | |
| 485 490 495 | |
| ACT ATT ACT GCC ATG ATT AAG GAC AAC GGT TTT TCA GGT GTG CCG | 1590 |
| Thr Ile Thr Ala Met Ile Lys Asp Asn Gly Phe Ser Gly Val Ala | |
| 500 505 510 | |
| AAA ACC GGT GAA AAC GGC TTT GCG CTG GAT CCG CAA AAT ACC GGA | 1635 |
| Lys Thr Gly Glu Asn Gly Phe Ala Leu Asp Pro Gln Asn Thr Gly | |
| 515 520 525 | |
| AAT TCC CAC TAT ACG CAT ATT GAA GCC ACT GTA TCC GGC GGT TTC | 1680 |
| Asn Ser His Tyr Thr His Ile Glu Ala Thr Val Ser Gly Gly Phe | |
| 530 535 540 | |
| TAC GGC AAA AAC GCC ATC GAG ATG GGC GGA TCG TTC TCA TTT CCG | 1725 |
| Tyr Gly Lys Asn Ala Ile Glu Met Gly Gly Ser Phe Ser Phe Pro | |
| 545 550 555 | |
| GGA AAT GCA CCA GAG GGA AAA CAA GAA AAA GCA TCG GTG GTA TTC | 1770 |
| Gly Asn Ala Pro Glu Gly Lys Gln Glu Lys Ala Ser Val Val Phe | |
| 560 565 570 | |
| GGT GCG AAA CGC CAA CAG CTT GTG CAA TAA GCACGGCT | 1808 |
| Gly Ala Lys Arg Gln Gln Leu Val Gln | |
| 575 | |

SEQ ID NO : 2

Objet : Séquence de l'ADN génomique de la souche de *N. meningitidis* IM2394 codant pour le précurseur de la sous-unité Tbp1 du récepteur de la transferrine et séquence protéique déduite. Le peptide signal est indiqué en caractères gras.

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|-----|
| CTTCCGATG CCGTCTGAAA GCGAAGATTA GGGAAACACT | | | | | | | | | | | | | | | | 40 |
| ATG | CAA | CAG | CAA | CAT | TTG | TTC | CGA | TTA | AAT | ATT | TTA | TGC | CTG | TCT | | 85 |
| Met | Gln | Gln | Gln | His | Leu | Phe | Arg | Leu | Asn | Ile | Leu | Cys | Leu | Ser | | |
| -24 | | | | -20 | | | | | -15 | | | | | -10 | | |
| TTA | ATG | ACC | GCG | CTG | CCC | GTT | TAT | GCA | GAA | AAT | GTG | CAA | GCC | GAA | | 130 |
| Leu | Met | Thr | Ala | Leu | Pro | Val | Tyr | Ala | Glu | Asn | Val | Gln | Ala | Glu | | |
| | | | -5 | | | | | -1 | 1 | | | | 5 | | | |
| CAA | GCA | CAG | GAA | AAA | CAG | TTG | GAT | ACC | ATA | CAG | GTA | AAA | GCC | AAA | | 175 |
| Gln | Ala | Gln | Glu | Lys | Gln | Leu | Asp | Thr | Ile | Gln | Val | Lys | Ala | Lys | | |
| | | | 10 | | | | | 15 | | | | | 20 | | | |
| AAA | CAG | AAA | ACC | CGC | CGC | GAT | AAC | GAA | GTA | ACC | GGG | CTG | GGC | AAG | | 220 |
| Lys | Gln | Lys | Thr | Arg | Arg | Asp | Asn | Glu | Val | Thr | Gly | Leu | Gly | Lys | | |
| | | | 25 | | | | | 30 | | | | | 35 | | | |
| TTG | GTC | AAG | TCT | TCC | GAT | ACG | CTA | AGT | AAA | GAA | CAG | GTT | TTG | AAT | | 265 |
| Leu | Val | Lys | Ser | Ser | Asp | Thr | Leu | Ser | Lys | Glu | Gln | Val | Leu | Asn | | |
| | | | 40 | | | | | 45 | | | | | 50 | | | |
| ATC | CGA | GAC | CTG | ACC | CGT | TAT | GAT | CCG | GGT | ATT | GCC | GTG | GTC | GAA | | 310 |
| Ile | Arg | Asp | Leu | Thr | Arg | Tyr | Asp | Pro | Gly | Ile | Ala | Val | Val | Glu | | |
| | | | 55 | | | | | 60 | | | | | 65 | | | |
| CAG | GGT | CGG | GGC | GCA | AGT | TCC | GGC | TAT | TCA | ATA | CGC | GGC | ATG | GAT | | 355 |
| Gln | Gly | Arg | Gly | Ala | Ser | Ser | Gly | Tyr | Ser | Ile | Arg | Gly | Met | Asp | | |
| | | | 70 | | | | | 75 | | | | | 80 | | | |
| AAA | AAC | CGC | GTT | TCC | TTA | ACG | GTA | GAC | GGC | GTT | TCG | CAA | ATA | CAG | | 400 |
| Lys | Asn | Arg | Val | Ser | Leu | Thr | Val | Asp | Gly | Val | Ser | Gln | Ile | Gln | | |
| | | | 85 | | | | | 90 | | | | | 95 | | | |
| TCC | TAC | ACC | GCG | CAG | GCG | GCA | TTG | GGT | GGG | ACG | AGG | ACG | GCG | GGT | | 445 |
| Ser | Tyr | Thr | Ala | Gln | Ala | Ala | Leu | Gly | Gly | Thr | Arg | Thr | Ala | Gly | | |
| | | | 100 | | | | | 105 | | | | | 110 | | | |
| AGC | AGC | GGC | GCA | ATC | AAT | GAA | ATC | GAG | TAT | GAA | AAC | GTC | AAG | GCC | | 490 |
| Ser | Ser | Gly | Ala | Ile | Asn | Glu | Ile | Glu | Tyr | Glu | Asn | Val | Lys | Ala | | |
| | | | 115 | | | | | 120 | | | | | 125 | | | |
| GTT | GAA | ATC | AGC | AAG | GGT | TCG | AAT | TCA | TCA | GAA | TAC | GGA | AAC | GGC | | 535 |
| Val | Glu | Ile | Ser | Lys | Gly | Ser | Asn | Ser | Ser | Glu | Tyr | Gly | Asn | Gly | | |
| | | | 130 | | | | | 135 | | | | | 140 | | | |
| GCA | TTG | GCA | GGT | TCG | GTC | GCA | TTT | CAA | ACC | AAA | ACC | GCA | GCC | GAC | | 580 |
| Ala | Leu | Ala | Gly | Ser | Val | Ala | Phe | Gln | Thr | Lys | Thr | Ala | Ala | Asp | | |
| | | | 145 | | | | | 150 | | | | | 155 | | | |

| | |
|---|------|
| ATT ATC GGA GAG GGA AAA CAG TGG GGC ATT CAG AGT AAA ACT GCC Ile Ile Gly Glu Gly Lys Gln Trp Gly Ile Gln Ser Lys Thr Ala 160 165 170 | 625 |
| TAT TCG GGA AAA GAC CAT GCC CTG ACG CAA TCC CTT GCG CTT GCC Tyr Ser Gly Lys Asp His Ala Leu Thr Gln Ser Leu Ala Leu Ala 175 180 185 | 670 |
| GGA CGC AGC GGC GGC GCG GAA GCC CTC CTT ATT TAT ACT AAA CGG Gly Arg Ser Gly Gly Ala Glu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Lys Arg 190 195 200 | 715 |
| CGG GGT CGG GAA ATC CAT GCG CAT AAA GAT GCC GGC AAG GGT GTG Arg Gly Arg Glu Ile His Ala His Lys Asp Ala Gly Lys Gly Val 205 210 215 | 760 |
| CAG AGC TTC AAC CGG CTG GTG TTG GAC GAG GAC AAG AAG GAG GGT Gln Ser Phe Asn Arg Leu Val Leu Asp Glu Asp Lys Lys Glu Gly 220 225 230 | 805 |
| GGC AGT CAG TAC AGA TAT TTC ATT GTC GAA GAA GAA TGC CAC AAT Gly Ser Gln Tyr Arg Tyr Phe Ile Val Glu Glu Glu Cys His Asn 235 240 245 | 850 |
| GGA TAT GCG GCC TGT AAA AAC AAG CTG AAA GAA GAT GCC TCG GTC Gly Tyr Ala Ala Cys Lys Asn Lys Leu Lys Glu Asp Ala Ser Val 250 255 260 | 895 |
| AAA GAT GAG CGC AAA ACC GTC AGC ACC CAG GAT TAT ACC GGC TCC Lys Asp Glu Arg Lys Thr Val Ser Thr Gln Asp Tyr Thr Gly Ser 265 270 275 | 940 |
| AAC CGC TTA CTT GCG AAC CCG CTT GAG TAT GGC AGC CAA TCA TGG Asn Arg Leu Leu Ala Asn Pro Leu Glu Tyr Gly Ser Gln Ser Trp 280 285 290 | 985 |
| CTG TTC CGA CCG GGT TGG CAT TTG GAC AAC CGC CAT TAT GTC GGA Leu Phe Arg Pro Gly Trp His Leu Asp Asn Arg His Tyr Val Gly 295 300 305 | 1030 |
| GCC GTT CTC GAA CGT ACG CAG CAG ACC TTT GAT ACA CGG GAT ATG Ala Val Leu Glu Arg Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met 310 315 320 | 1075 |
| ACT GTT CCT GCC TAT TTT ACC AGT GAA GAT TAT GTA CCC GGT TCG Thr Val Pro Ala Tyr Phe Thr Ser Glu Asp Tyr Val Pro Gly Ser 325 330 335 | 1120 |
| CTG AAA GGT CTT GGC AAA TAT TCG GGC GAT AAT AAG GCA GAA AGG Leu Lys Gly Leu Gly Lys Tyr Ser Gly Asp Asn Lys Ala Glu Arg 340 345 350 | 1165 |
| CTG TTT GTT CAG GGA GAG GGC AGT ACA TTG CAG GGT ATC GGT TAC Leu Phe Val Gln Gly Glu Gly Ser Thr Leu Gln Gly Ile Gly Tyr 355 360 365 | 1210 |
| GGT ACC GGC GTG TTT TAT GAT GAA CGC CAT ACT AAA AAC CGC TAC Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Arg His Thr Lys Asn Arg Tyr 370 375 380 | 1255 |
| GGG GTC GAA TAT GTT TAC CAT AAT GCT GAT AAG GAT ACC TGG GCC Gly Val Glu Tyr Val Tyr His Asn Ala Asp Lys Asp Thr Trp Ala 385 390 395 | 1300 |

| | |
|--|------|
| GAT TAC GCC CGA CTT TCT TAT GAC CGG CAA GGT ATA GAT TTG GAC Asp Tyr Ala Arg Leu Ser Tyr Asp Arg Gln Gly Ile Asp Leu Asp 400 405 410 | 1345 |
| AAC CGT TTG CAG CAG ACG CAT TGC TCT CAC GAC GGT TCG GAT AAA Asn Arg Leu Gln Gln Thr His Cys Ser His Asp Gly Ser Asp Lys 415 420 425 | 1390 |
| AAT TGC CGT CCC GAC GGC AAT AAA CCG TAT TCT TTC TAT AAA TCC Asn Cys Arg Pro Asp Gly Asn Lys Pro Tyr Ser Phe Tyr Lys Ser 430 435 440 | 1435 |
| GAC CGG ATG ATT TAT GAA GAA AGC CGA AAC CTG TTC CAA GCA GTA Asp Arg Met Ile Tyr Glu Glu Ser Arg Asn Leu Phe Gln Ala Val 445 450 455 | 1480 |
| TTT AAA AAG GCA TTT GAT ACG GCC AAA ATC CGT CAC AAT TTG AGT Phe Lys Lys Ala Phe Asp Thr Ala Lys Ile Arg His Asn Leu Ser 460 465 470 | 1525 |
| ATC AAT CTA GGG TAC GAC CGC TTT AAG TCG CAA TTG TCC CAC AGC Ile Asn Leu Gly Tyr Asp Arg Phe Lys Ser Gln Leu Ser His Ser 475 4800 485 | 1570 |
| GAT TAT TAT CTT CAA AAC GCA GTT CAG GCA TAT GAT TTG ATA ACC Asp Tyr Tyr Leu Gln Asn Ala Val Gln Ala Tyr Asp Leu Ile Thr 490 495 500 | 1615 |
| CCG AAA AAG CCT CCG TTT CCC AAC GGA AGC AAA GAC AAC CCG TAT Pro Lys Lys Pro Pro Phe Pro Asn Gly Ser Lys Asp Asn Pro Tyr 505 510 515 | 1660 |
| AGG GTG TCT ATC GGC AAG ACC ACG GTC AAT ACA TCG CCG ATA TGC Arg Val Ser Ile Gly Lys Thr Thr Val Asn Thr Ser Pro Ile Cys 520 525 530 | 1705 |
| CGT TTC GGC AAT AAC ACC TAT ACA GAC TGC ACA CCG AGG AAT ATC Arg Phe Gly Asn Asn Thr Tyr Thr Asp Cys Thr Pro Arg Asn Ile 535 540 545 | 1750 |
| GGC GGC AAC GGT TAT TAT GCA GCC GTT CAA GAC AAT GTC CGT TTG Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Ala Ala Val Gln Asp Asn Val Arg Leu 550 555 560 | 1795 |
| GGC AGG TGG GCG GAT GTC GGA GCA GGC ATA CGT TAC GAT TAC CGC Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Arg 565 570 575 | 1840 |
| AGC ACG CAT TCG GAA GAT AAG AGT GTC TCT ACC GGC ACT CAC CGC Ser Thr His Ser Glu Asp Lys Ser Val Ser Thr Gly Thr His Arg 580 585 590 | 1885 |
| AAC CTT TCT TGG AAC GCG GGC GTA GTC CTC AAA CCT TTC ACC TGG Asn Leu Ser Trp Asn Ala Gly Val Val Leu Lys Pro Phe Thr Trp 595 600 605 | 1930 |
| ATG GAT TTG ACT TAT CGC GCT TCT ACG GGC TTC CGT CTG CCG TCG Met Asp Leu Thr Tyr Arg Ala Ser Thr Gly Phe Arg Leu Pro Ser 610 615 620 | 1975 |
| TTT GCC GAA ATG TAT GGC TGG AGA GCC GGG GAG TCT TTG AAA ACG Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ala Gly Glu Ser Leu Lys Thr 625 630 635 | 2020 |

| | |
|---|------|
| GGC GGC AAC GGT TAT TAT GCA GCC GTT CAA GAC AAT GTC CGT TTG Gly Gly Asn Gly Tyr Tyr Ala Ala Val Gln Asp Asn Val Arg Leu 550 555 560 | 1795 |
| GGC AGG TGG GCG GAT GTC GGA GCA GGC ATA CGT TAC GAT TAC CGC Gly Arg Trp Ala Asp Val Gly Ala Gly Ile Arg Tyr Asp Tyr Arg 565 570 575 | 1840 |
| AGC ACG CAT TCG GAA GAT AAG AGT GTC TCT ACC GGC ACT CAC CGC Ser Thr His Ser Glu Asp Lys Ser Val Ser Thr Gly Thr His Arg 580 585 590 | 1885 |
| AAC CTT TCT TGG AAC GCG GGC GTA GTC CTC AAA CCT TTC ACC TGG Asn Leu Ser Trp Asn Ala Gly Val Val Leu Lys Pro Phe Thr Trp 595 600 605 | 1930 |
| ATG GAT TTG ACT TAT CGC GCT TCT ACG GGC TTC CGT CTG CCG TCG Met Asp Leu Thr Tyr Arg Ala Ser Thr Gly Phe Arg Leu Pro Ser 610 615 620 | 1975 |
| TTT GCC GAA ATG TAT GGC TGG AGA GCC GGG GAG TCT TTG AAA ACG Phe Ala Glu Met Tyr Gly Trp Arg Ala Gly Glu Ser Leu Lys Thr 625 630 635 | 2020 |
| TTG GAT CTG AAA CCG GAA AAA TCC TTT AAT AGA GAG GCA GGT ATT Leu Asp Leu Lys Pro Glu Lys Ser Phe Asn Arg Glu Ala Gly Ile 640 645 650 | 2065 |
| GTA TTT AAA GGG GAC TTC GGC AAT TTG GAA GCC AGC TAT TTC AAC Val Phe Lys Gly Asp Phe Gly Asn Leu Glu Ala Ser Tyr Phe Asn 655 660 665 | 2110 |
| AAT GCC TAT CGC GAC CTG ATT GCA TTC GGT TAT GAA ACC CGA ACT Asn Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Ala Phe Gly Tyr Glu Thr Arg Thr 670 675 680 | 2155 |
| CAA AAC GGG CAA ACT TCG GCT TCT GGC GAC CCC GGA TAC CGA AAT Gln Asn Gly Gln Thr Ser Ala Ser Gly Asp Pro Gly Tyr Arg Asn 685 690 695 | 2200 |
| GCC CAA AAT GCA CGG ATA GCC GGT ATC AAT ATT TTG GGT AAA ATC Ala Gln Asn Ala Arg Ile Ala Gly Ile Asn Ile Leu Gly Lys Ile 700 705 710 | 2245 |
| GAT TGG CAC GGC GTA TGG GGC GGG TTG CCG GAC GGG TTG TAT TCC Asp Trp His Gly Val Trp Gly Gly Leu Pro Asp Gly Leu Tyr Ser 715 720 725 | 2290 |
| ACG CTT GCC TAT AAC CGT ATC AAG GTC AAA GAT GCC GAT ATA CGC Thr Leu Ala Tyr Asn Arg Ile Lys Val Lys Asp Ala Asp Ile Arg 730 735 740 | 2335 |
| GCC GAC AGG ACG TTT GTA ACT TCA TAT CTC TTT GAT GCC GTC CAA Ala Asp Arg Thr Phe Val Thr Ser Tyr Leu Phe Asp Ala Val Gln 745 750 755 | 2380 |
| CCT TCA CGA TAT GTA TTG GGT TTG GGT TAC GAC CAT CCT GAC GGA Pro Ser Arg Tyr Val Leu Gly Leu Gly Tyr Asp His Pro Asp Gly 760 765 770 | 2425 |
| ATA TGG GGC ATC AAT ACG ATG TTT ACT TAT TCC AAG GCA AAA TCT Ile Trp Gly Ile Asn Thr Met Phe Thr Tyr Ser Lys Ala Lys Ser 775 780 785 | 2470 |

ACA TTT AGC TTG GAA ATG AAG TTT TAA ACGTCCAAAC GCCGCAAATG
Thr Phe Ser Leu Glu Met Lys Phe
880

2787

CCGTCTGAAA GGCT

2801

SEQ ID NO : 3

Objet : Séquence de l'ADN génomique de la souche de *N. meningitidis* IM2169
codant pour le précurseur de la sous-unité Tbp1 et séquence protéique déduite.
Le peptide signal est indiqué en caractères gras.

| | | |
|---|--|-----|
| | ATCAAGAATA AGGCTTCAGA | 20 |
| | CGGCATCGCT CCTTCCGATA CCGTCTGAAA GCGAAGATTA GGGAAACATT | 70 |
| ATG CAA CAG CAA CAT TTG TTC CGA TTA AAT ATT TTA TGC CTG TCG | | 115 |
| Met Gln Gln Gln His Leu Phe Arg Leu Asn Ile Leu Cys Leu Ser | | |
| -24 -20 -15 -10 | | |
| CTG ATG ACT GCG CTG CCT GCT TAT GCA GAA AAT GTG CAA GCC GGA | | 160 |
| Leu Met Thr Ala Leu Pro Ala Tyr Ala Glu Asn Val Gln Ala Gly | | |
| -5 -1 1 5 | | |
| CAA GCA CAG GAA AAA CAG TTG GAT ACC ATA CAG GTA AAA GCC AAA | | 205 |
| Gln Ala Gln Glu Lys Gln Leu Asp Thr Ile Gln Val Lys Ala Lys | | |
| 10 15 20 | | |
| AAA CAG AAA ACC CGC CGC GAT AAC GAA GTA ACC GGT CTG GGC AAA | | 250 |
| Lys Gln Lys Thr Arg Arg Asp Asn Glu Val Thr Gly Leu Gly Lys | | |
| 25 30 35 | | |
| TTG GTC AAA ACC GCC GAC ACC CTC AGC AAG GAA CAG GTA CTC GAT | | 295 |
| Leu Val Lys Thr Ala Asp Thr Leu Ser Lys Glu Gln Val Leu Asp | | |
| 40 45 50 | | |
| ATC CGC GAC CTG ACG CGT TAC GAC CCC GGC ATC GCC GTG GTC GAA | | 340 |
| Ile Arg Asp Leu Thr Arg Tyr Asp Pro Gly Ile Ala Val Val Glu | | |
| 55 60 65 | | |
| CAG GGG CGC GGC GCA AGT TCG GGC TAC TCG ATA CGC GGT ATG GAC | | 385 |
| Gln Gly Arg Gly Ala Ser Ser Gly Tyr Ser Ile Arg Gly Met Asp | | |
| 70 75 80 | | |
| AAA AAC CGC GTT TCC TTG ACG GTG GAC GGC TTG GCG CAA ATA CAG | | 430 |
| Lys Asn Arg Val Ser Leu Thr Val Asp Gly Leu Ala Gln Ile Gln | | |
| 85 90 95 | | |
| TCC TAC ACC GCG CAG GCG GCA TTG GGC GGG ACG AGG ACG GCG GGC | | 475 |
| Ser Tyr Thr Ala Gln Ala Ala Leu Gly Gly Thr Arg Thr Ala Gly | | |
| 100 105 110 | | |
| AGC AGC GGC GCA ATC AAT GAA ATC GAG TAT GAA AAC GTC AAA GCT | | 520 |
| Ser Ser Gly Ala Ile Asn Glu Ile Glu Tyr Glu Asn Val Lys Ala | | |
| 115 120 125 | | |
| GTC GAA ATC AGC AAA GGC TCA AAC TCG GTC GAA CAA GGC AGC GGC | | 565 |
| Val Glu Ile Ser Lys Gly Ser Asn Ser Val Glu Gln Gly Ser Gly | | |
| 130 135 140 | | |

- 37 -

| | |
|---|------|
| GCA TTG GCG GGT TCG GTC GCA TTT CAA ACC AAA ACC GCC GAC GAT Ala Leu Ala Gly Ser Val Ala Phe Gln Tyr Lys Thr Ala Asp Asp 145 150 155 | 600 |
| GTT ATC GGG GAA GGC AGG CAG TGG GGC ATT CAG AGT AAA ACC GCC Val Ile Gly Glu Gly Arg Gln Trp Gly Ile Gln Ser Lys Thr Ala 160 165 170 | 645 |
| TAT TCC GGC AAA AAC CGG GGG CTT ACC CAA TCC ATC GCG CTG GCG Tyr Ser Gly Lys Asn Arg Gly Leu Thr Gln Ser Ile Ala Leu Ala 175 180 185 | 690 |
| GGG CGC ATC GGC GGT GCG GAG GCT TTG CTG ATC CAC ACC GGG CGG Gly Arg Ile Gly Gly Ala Glu Ala Leu Leu Ile His Thr Gly Arg 190 195 200 | 735 |
| CGC GCG GGG GAA ATC CGC GCA CAC GAA GAT GCC GGA CGC GGC GTT Arg Ala Gly Glu Ile Arg Ala His Glu Asp Ala Gly Arg Gly Val 205 210 215 | 780 |
| CAG AGC TTT AAC AGG CTG GTG CCG GTT GAA GAC AGC AGC GAA TAC Gln Ser Phe Asn Arg Leu Val Pro Val Glu Asp Ser Ser Glu Tyr 220 225 230 | 825 |
| GCC TAT TTC ATC GTT GAA GAT GAA TGC GAA GGC AAA AAT TAC GAA Ala Tyr Phe Ile Val Glu Asp Glu Cys Glu Gly Lys Asn Tyr Glu 235 240 245 | 870 |
| ACG TGT AAA AGC AAA CCG AAA AAA GAT GTT GTC GGC AAA GAC GAA Thr Cys Lys Ser Lys Pro Lys Lys Asp Val Val Gly Lys Asp Glu 250 255 260 | 915 |
| CGT CAA ACG GTT TCC ACC CGA GAC TAC ACG GGC CCC AAC CGC TTC Arg Gln Thr Val Ser Thr Arg Asp Tyr Thr Gly Pro Asn Arg Phe 265 270 275 | 960 |
| CTC GCC GAT CCG CTT TCA TAC GAA AGC CGA TCG TGG CTG TTC CGC Leu Ala Asp Pro Leu Ser Tyr Glu Ser Arg Ser Trp Leu Phe Arg 280 285 290 | 1005 |
| CCG GGT TTT CGT TTT GAA AAC AAA CGG CAC TAC ATC GGC GGC ATA Pro Gly Phe Arg Phe Glu Asn Lys Arg His Tyr Ile Gly Gly Ile 295 300 305 | 1050 |
| CTC GAA CAC ACG CAA CAA ACT TTC GAC ACG CGC GAT ATG ACG GTT Leu Glu His Thr Gln Gln Thr Phe Asp Thr Arg Asp Met Thr Val 310 315 320 | 1095 |
| CCG GCA TTC CTG ACC AAG GCG GTT TTT GAT GCA AAT TCA AAA CAG Pro Ala Phe Leu Thr Lys Ala Val Phe Asp Ala Asn Ser Lys Gln 325 330 335 | 1140 |
| GCG GGT TCT TTG CCC GGC AAC GGC AAA TAC GCG GGC AAC CAC AAA Ala Gly Ser Leu Pro Gly Asn Gly Lys Tyr Ala Gly Asn His Lys 340 345 350 | 1185 |
| TAC GGC GGA CTG TTT ACC AAC GGC GAA AAC GGT GCG CTG GTG GGC Tyr Gly Gly Leu Phe Thr Asn Gly Glu Asn Gly Ala Leu Val Gly 355 360 365 | 1230 |
| GCG GAA TAC GGT ACG GGC GTG TTT TAC GAC GAG ACG CAC ACC AAA Ala Glu Tyr Gly Thr Gly Val Phe Tyr Asp Glu Thr His Thr Lys 370 375 380 | 1275 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| AGC | CGC | TAC | GGT | TTG | GAA | TAT | GTC | TAT | ACC | AAT | GCC | GAT | AAA | GAC | 1320 |
| Ser | Arg | Tyr | Gly | Leu | Glu | Tyr | Val | Tyr | Thr | Asn | Ala | Asp | Lys | Asp | |
| | | | 325 | | | | | 390 | | | | | 395 | | |
| ACT | TGG | CGC | GAT | TAT | GCC | CGC | CTC | TCT | TAC | GAC | CGG | CAG | GGC | ATC | 1365 |
| Thr | Trp | Ala | Asp | Tyr | Ala | Arg | Leu | Ser | Tyr | Asp | Arg | Gln | Gly | Ile | |
| | | | 400 | | | | 405 | | | | | | 410 | | |
| GGT | TTG | GAC | AAT | CAT | TTT | CAG | CAG | ACG | CAC | TGT | TCT | GCC | GAC | GGT | 1410 |
| Gly | Leu | Asp | Asn | His | Phe | Gln | Gln | Thr | His | Cys | Ser | Ala | Asp | Gly | |
| | | | 415 | | | | 420 | | | | | | 425 | | |
| TCG | GAC | AAA | TAT | TGC | CGC | CCG | AGT | GCC | GAC | AAG | CCG | TTT | TCC | TAT | 1455 |
| Ser | Asp | Lys | Tyr | Cys | Arg | Pro | Ser | Ala | Asp | Lys | Pro | Phe | Ser | Tyr | |
| | | | 430 | | | | | 435 | | | | | 440 | | |
| TAC | AAA | TCC | GAC | CGC | GTG | ATT | TAC | GGG | GAA | AGC | CAC | AGG | CTC | TTG | 1500 |
| Tyr | Lys | Ser | Asp | Arg | Val | Ile | Tyr | Gly | Glu | Ser | His | Arg | Leu | Leu | |
| | | | 445 | | | | | 450 | | | | | 455 | | |
| CAG | CGC | GCA | TTC | AAA | AAA | TCC | TTC | GAT | ACC | GCC | AAA | ATC | CGC | CAC | 1545 |
| Gln | Ala | Ala | Phe | Lys | Lys | Ser | Phe | Asp | Thr | Ala | Lys | Ile | Arg | His | |
| | | | 460 | | | | | 465 | | | | | 470 | | |
| AAC | CTG | AGC | GTG | AAT | CTC | GGG | TTT | GAC | CGC | TTT | GAC | TCT | AAT | CTC | 1590 |
| Asn | Leu | Ser | Val | Asn | Leu | Gly | Phe | Asp | Arg | Phe | Asp | Ser | Asn | Leu | |
| | | | 475 | | | | | 480 | | | | | 485 | | |
| CGC | CAT | CAG | GAT | TAT | TAT | TAT | CAA | CAT | GCC | AAC | CGC | GCC | TAT | TCG | 1635 |
| Arg | His | Gln | Asp | Tyr | Tyr | Tyr | Gln | His | Ala | Asn | Arg | Ala | Tyr | Ser | |
| | | | 490 | | | | | 495 | | | | | 500 | | |
| TCG | AAA | ACG | CCC | CCT | AAA | ACC | GCC | AAC | CCC | AAC | GGC | GAC | AAG | AGC | 1680 |
| Ser | Lys | Thr | Pro | Pro | Lys | Thr | Ala | Asn | Pro | Asn | Gly | Asp | Lys | Ser | |
| | | | 505 | | | | 510 | | | | | | 515 | | |
| AAA | CCC | TAT | TGG | GTC | AGC | ATA | GGC | GGG | GGA | AAT | GTG | GTT | ACG | GGG | 1725 |
| Lys | Pro | Tyr | Trp | Val | Ser | Ile | Gly | Gly | Gly | Asn | Val | Val | Thr | Gly | |
| | | | 520 | | | | 525 | | | | | | 530 | | |
| CAA | ATC | TGC | CTC | TTT | GGC | AAC | AAT | ACT | TAT | ACG | GAC | TGC | ACG | CCG | 1770 |
| Gln | Ile | Cys | Leu | Phe | Gly | Asn | Asn | Thr | Tyr | Thr | Asp | Cys | Thr | Pro | |
| | | | 535 | | | | | 540 | | | | | 545 | | |
| CGC | AGC | ATC | AAC | GGC | AAA | AGC | TAT | TAC | CGC | GCA | GTT | CGG | GAC | AAT | 1815 |
| Arg | Ser | Ile | Asn | Gly | Lys | Ser | Tyr | Tyr | Ala | Ala | Val | Arg | Asp | Asn | |
| | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | | |
| GTC | CGT | TTG | GGC | AGG | TGG | CGC | GAT | GTC | GGC | CGC | GGG | TTG | CGC | TAC | 1860 |
| Val | Arg | Leu | Gly | Arg | Trp | Ala | Asp | Val | Gly | Ala | Gly | Leu | Arg | Tyr | |
| | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| GAC | TAC | CGC | AGC | ACG | CAT | TCG | GAC | GAC | GGC | AGC | GTT | TCC | ACC | GGC | 1905 |
| Asp | Tyr | Arg | Ser | Thr | His | Ser | Asp | Asp | Gly | Ser | Val | Ser | Thr | Gly | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | |
| ACG | CAC | CGC | ACC | CTG | TCC | TGG | AAC | GCC | GGC | ATC | GTC | CTC | AAA | CCT | 1950 |
| Thr | His | Arg | Thr | Leu | Ser | Trp | Asn | Ala | Gly | Ile | Val | Leu | Lys | Pro | |
| | | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | |
| GCC | GAC | TGG | CTG | GAT | TTG | ACT | TAC | CGC | ACT | TCA | ACC | GGC | TTC | CGC | 1995 |
| Ala | Asp | Trp | Leu | Asp | Leu | Thr | Tyr | Arg | Thr | Ser | Thr | Gly | Phe | Arg | |
| | | | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | |

SEQ ID NO : 4

Objet : Sequence de l'ADN génomique de la souche de *N. meningitidis* IM2169
codant pour le précurseur de la sous-unité Tbp2 et séquence protéique déduite.
Le peptide signal est indiqué en caractère gras.

| | |
|--|-----|
| ATTGTTAA AAATAATAA AATAATAATC CTTATCATTC TTTAATTGAA TTGGGTTTAT | 59 |
| ATG AAC AAT CCA TTG GTA AAT CAG GCT GCT ATG GTG CTG CCT GTG | 104 |
| Met Asn Asn Pro Leu Val Asn Gln Ala Met Val Leu Pro Val | |
| -20 -15 -10 | |
| TTT TTG TTG AGT GCC TGT CTG GGC GGC GGC GGC AGT TTC GAT CTT | 149 |
| Phe Leu Leu Ser Ala Cys Leu Gly Gly Gly Ser Phe Asp Leu | |
| -5 -1 1 5 10 | |
| GAT TCT GTC GAT ACC GAA GCC CCG CGT CCC GCG CCA AAG TAT CAA | 194 |
| Asp Ser Val Asp Thr Glu Ala Pro Arg Pro Ala Pro Lys Tyr Gln | |
| 15 20 25 | |
| GAT GTT TCT TCC GAA AAA CCG CAA GCC CAA AAA GAC CAA GGC GGA | 239 |
| Asp Val Ser Ser Glu Lys Pro Gln Ala Gln Lys Asp Gln Gly Gly | |
| 30 35 40 | |
| TAC GGT TTT GCG ATG AGG TTG AAA CCG AGG AAT TGG TAT CCG GGG | 284 |
| Tyr Gly Phe Ala Met Arg Leu Lys Arg Arg Asn Trp Tyr Pro Gly | |
| 45 50 55 | |
| GCA GAA GAA AGC GAG GTT AAA CTG AAC GAG AGT GAT TGG GAG GCG | 329 |
| Ala Glu Glu Ser Glu Val Lys Leu Asn Glu Ser Asp Trp Glu Ala | |
| 60 65 70 | |
| ACG GGA TTG CCG ACA AAA CCC AAG GAA CTT CCT AAA CCG CAA AAA | 374 |
| Thr Gly Leu Pro Thr Lys Pro Lys Glu Leu Pro Lys Arg Gln Lys | |
| 75 80 85 | |
| TCG GTT ATT GAA AAA GTA GAA ACA GAC GGC GAC AGC GAT ATT TAT | 419 |
| Ser Val Ile Glu Lys Val Glu Thr Asp Gly Asp Ser Asp Ile Tyr | |
| 90 95 100 | |
| TCT TCC CCC TAT CTC ACA CCA TCA AAC CAT CAA AAC GGC AGC GCT | 464 |
| Ser Ser Pro Tyr Leu Thr Pro Ser Asn His Gln Asn Gly Ser Ala | |
| 105 110 115 | |
| GGC AAC GGT GTA AAT CAA CCT AAA AAT CAG GCA ACA GGT CAC GAA | 509 |
| Gly Asn Gly Val Asn Gln Pro Lys Asn Gln Ala Thr Gly His Glu | |
| 120 125 130 | |
| AAT TTC CAA TAT GTT TAT TCC GGT TGG TTT TAT AAA CAT GCA GCG | 554 |
| Asn Phe Gln Tyr Val Tyr Ser Gly Trp Phe Tyr Lys His Ala Ala | |
| 135 140 145 | |
| AGT GAA AAA GAT TTC AGT AAC AAA AAA ATT AAG TCA GGC GAC GAT | 599 |
| Ser Glu Lys Asp Phe Ser Asn Lys Lys Ile Lys Ser Gly Asp Asp | |
| 150 155 160 | |

| | |
|---|------|
| GGT TAT ATC TTC TAT CAC GGT GAA AAA CCT TCC CGA CAA CTT CCT Gly Tyr Ile Phe Tyr His Gly Glu Lys Pro Ser Arg Gln Leu Pro 165 170 175 | 644 |
| GCT TCT GGA AAA GTT ATC TAC AAA GGT GTG TGG CAT TTT GTA ACC Ala Ser Gly Lys Val Ile Tyr Lys Gly Val Trp His Phe Val Thr 180 185 190 | 689 |
| GAT ACA AAA AAG GGT CAA GAT TTT CGT GAA ATT ATC CAG CCT TCA Asp Thr Lys Lys Gly Gln Asp Phe Arg Glu Ile Ile Gln Pro Ser 195 200 205 | 734 |
| AAA AAA CAA GGC GAC AGG TAT AGC GGA TTT TCT GGT GAT GGC AGC Lys Lys Gln Gly Asp Arg Tyr Ser Gly Phe Ser Gly Asp Gly Ser 210 215 220 | 779 |
| GAA GAA TAT TCC AAG AAA AAC GAA TCC ACG CTG AAA GAT GAT CAC Glu Glu Tyr Ser Asn Lys Asn Glu Ser Thr Leu Lys Asp Asp His 225 230 235 | 824 |
| GAG GGT TAT GGT TTT ACC TCG AAT TTA GAA GTG GAT TTC GGC AAT Glu Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Asn Leu Glu Val Asp Phe Gly Asn 240 245 250 | 869 |
| AAG AAA TTG ACG GGT AAA TTA ATA CGC AAT AAT GCG AGC CTA AAT Lys Lys Leu Thr Gly Lys Leu Ile Arg Asn Asn Ala Ser Leu Asn 255 260 265 | 914 |
| AAT AAT ACT AAT AAT GAC AAA CAT ACC ACC CAA TAC TAC AGC CTT Asn Asn Thr Asn Asn Asp Lys His Thr Thr Gln Tyr Tyr Ser Leu 270 275 280 | 959 |
| GAT GCA CAA ATA ACA GGC AAC CGC TTC AAC GGC ACG GCA ACG GCA Asp Ala Gln Ile Thr Gly Asn Arg Phe Asn Gly Thr Ala Thr Ala 285 290 295 | 1004 |
| ACT GAC AAA AAA GAG AAT GAA ACC AAA CTA CAT CCC TTT GTT TCC Thr Asp Lys Lys Glu Asn Glu Thr Lys Leu His Pro Phe Val Ser 300 305 310 | 1049 |
| GAC TCG TCT TCT TTG AGC GGC GGC TTT TTC GGC CCG CAG GGT GAG Asp Ser Ser Ser Leu Ser Gly Gly Phe Phe Gly Pro Gln Gly Glu 315 320 325 | 1094 |
| GAA TTG GGT TTC CGC TTT TTG AGC GAC GAT CAA AAA GTT GCC GTT Glu Leu Gly Phe Arg Phe Leu Ser Asp Asp Gln Lys Val Ala Val 330 335 340 | 1139 |
| GTC GGC AGC GCG AAA ACC AAA GAC AAA CTG GAA AAT GGC GCG GCG Val Gly Ser Ala Lys Thr Lys Asp Lys Leu Glu Asn Gly Ala Ala 345 350 355 | 1184 |
| GCT TCA GGC AGC ACA GGT GCG GCA GCA TCG GGC GGT GCG GCA GGC Ala Ser Gly Ser Thr Gly Ala Ala Ala Ser Gly Gly Ala Ala Gly 360 365 370 | 1229 |
| ACG TCG TCT GAA AAC AGT AAG CTG ACC ACG GTT TTG GAT GCG GTT Thr Ser Ser Glu Asn Ser Lys Leu Thr Thr Val Leu Asp Ala Val 375 380 385 | 1274 |
| GAA TTG ACA CTA AAC GAC AAG AAA ATC AAA AAT CTC GAC AAC TTC Glu Leu Thr Leu Asn Asp Lys Lys Ile Lys Asn Leu Asp Asn Phe 390 395 400 | 1319 |

| | |
|---|------|
| AGC AAT GCC GCC CAA CTG GTT GTC GAC GGC ATT ATG ATT CCG CTC Ser Asn Ala Ala Gln Leu Val Val Asp Gly Ile Met Ile Pro Leu 405 410 415 | 1364 |
| CTG CCC AAG GAT TCC GAA AGC GGG AAC ACT CAG GCA GAT AAA GGT Leu Pro Lys Asp Ser Glu Ser Gly Asn Thr Gln Ala Asp Lys Gly 420 425 430 | 1409 |
| AAA AAC GCC GGA ACA GAA TTT ACC CGC AAA TTT GAA CAC ACG CCG Lys Asn Gly Gly Thr Glu Phe Thr Arg Lys Phe Glu His Thr Pro 435 440 445 | 1454 |
| GAA AGT GAT AAA AAA GAC GCC CAA GCA GGT ACG CAG ACG AAT GGG Glu Ser Asp Lys Lys Asp Ala Gln Ala Gly Thr Gln Thr Asn Thr 450 455 460 | 1499 |
| CGC CAA ACC GCT TCA AAT ACG GCA GGT GAT ACC AAT GGC AAA ACA Ala Gln Thr Ala Ser Asn Thr Ala Gly Asp Thr Asn Gly Lys Thr 465 470 475 | 1544 |
| AAA ACC TAT GAA GTC GAA GTC TGC TGT TCC AAC CTC AAT TAT CTG Lys Thr Tyr Glu Val Glu Val Cys Cys Ser Asn Leu Asn Tyr Leu 480 485 490 | 1589 |
| AAA TAC GGA ATG TTG ACG CGC AAA AAC AGC AAG TCC GCG ATG CAG Lys Tyr Gly Met Leu Thr Arg Lys Asn Ser Lys Ser Ala Met Gln 495 500 505 | 1634 |
| GCA GGA GGA AAC AGT AGT CAA GCT GAT GCT AAA ACG GAA CAA GTT Ala Gly Gly Asn Ser Ser Gln Ala Asp Ala Lys Thr Glu Gln Val 510 515 520 | 1679 |
| GAA CAA AGT ATG TTC CTC CAA GGC GAG CGT ACC GAT GAA AAA GAG Glu Gln Ser Met Phe Leu Gln Gly Glu Arg Thr Asp Glu Lys Glu 525 530 535 | 1724 |
| ATT CCA ACC GAC CAA AAC GTC GTT TAT CGG GGG TCT TGG TAC GGG Ile Pro Thr Asp Gln Asn Val Val Tyr Arg Gly Ser Trp Tyr Gly 540 545 550 | 1769 |
| CAT ATT GCC AAC GGC ACA AGC TGG AGC GGC AAT GCT TCT GAT AAA His Ile Ala Asn Gly Thr Ser Trp Ser Gly Asn Ala Ser Asp Lys 555 560 565 | 1814 |
| GAG GGC GGC AAC AGG GCG GAA TTT ACT GTG AAT TTT GCC GAT AAA Glu Gly Gly Asn Arg Ala Glu Phe Thr Val Asn Phe Ala Asp Lys 570 575 580 | 1859 |
| AAA ATT ACC GGC AAG TTA ACC GCT GAA AAC AGG CAG GCG CAA ACC Lys Ile Thr Gly Lys Leu Thr Ala Glu Asn Arg Gln Ala Gln Thr 585 590 595 | 1904 |
| TTT ACC ATT GAG GGA ATG ATT CAG GGC AAC GGC TTT GAA GGT ACG Phe Thr Ile Glu Gly Met Ile Gln Gly Asn Gly Phe Glu Gly Thr 600 605 610 | 1949 |
| GCG AAA ACT GCT GAG TCA GGT TTT GAT CTC GAT CAA AAA AAT ACC Ala Lys Thr Ala Glu Ser Gly Phe Asp Leu Asp Gln Lys Asn Thr 615 620 625 | 1994 |
| ACC CGC ACG CCT AAG GCA TAT ATC ACA GAT GCC AAG GTA AAG GGC Thr Arg Thr Pro Lys Ala Tyr Ile Thr Asp Ala Lys Val Lys Gly 630 635 640 | 2039 |

- 44 -

| | |
|---|------|
| GGT TTT TAC GGG CCT AAA GCC GAA GAG TTG GGC GGA TGG TTT GCC | 2084 |
| Gly Phe Tyr Gly Pro Lys Ala Glu Glu Leu Gly Gly Trp Phe Ala | |
| 645 650 655 | |
| TAT CCG GGC GAT AAA CAA ACG GAA AAG GCA ACA GCT ACA TCC AGC | 2129 |
| Tyr Pro Gly Asp Lys Gln Thr Glu Lys Ala Thr Ala Thr Ser Ser | |
| 660 665 670 | |
| GAT GGA AAT TCA GCA AGC AGC GCG ACC GTG GTA TTC GGT GCG AAA | 2174 |
| Asp Gly Asn Ser Ala Ser Ser Ala Thr Val Val Phe Gly Ala Lys | |
| 675 680 685 | |
| CGC CAA CAG CCT GTG CAA <u>TAA</u> GCACGGTTGC CGAACAATCA AGAATAAGGC | 2225 |
| Arg Gln Gln Pro Val Gln | |
| 690 | |
| TTCAG | 2230 |

Revendications

1. Un fragment d'ADN isolé codant pour un peptide, un polypeptide ou une protéine capables d'être reconnus par un antisérum anti-récepteur de la transferrine de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169.
2. Un fragment d'ADN selon la revendication 1, qui comprend une séquence nucléotidique codant pour une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée :
 - dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
 - dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ;
ou
 - dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
3. Un fragment d'ADN selon la revendication 2, qui comprend une séquence nucléotidique codant pour une séquence d'acides aminés telle que montrée :
 - dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
 - dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ;
ou

- dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
4. Un fragment d'ADN selon la revendication 2, qui a une séquence nucléotidique codant pour une protéine ayant une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée :
- dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
 - dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ;
ou
 - dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
5. Un fragment d'ADN selon la revendication 4, qui a une séquence nucléotidique codant pour :
- i) la sous-unité Tbp1 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - ii) la sous-unité Tbp2 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
 - iii) la sous-unité Tbp1 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le

résidu acide glutamique en position 1 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ; ou

- iv) la sous-unité Tbp2 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu cystéine en position 1 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
6. Un fragment d'ADN selon la revendication 2, qui a une séquence nucléotidique codant pour un précurseur ayant une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée :
- dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu méthionine en position -20 et finissant avec le résidu glutamine en position 579 ;
 - dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu méthionine en position -24 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu méthionine en position -24 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ;
ou
 - dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu méthionine en position -20 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
7. Un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 et 2, qui a une séquence nucléotidique codant pour :
- i) Le précurseur de la sous-unité Tbp1 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu méthionine en position -24 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 884 ;
 - ii) Le précurseur de la sous-unité Tbp2 de la souche IM2394 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 1, commençant avec le résidu méthionine en position -20 et finissant

avec le résidu glutamine en position 579 ;

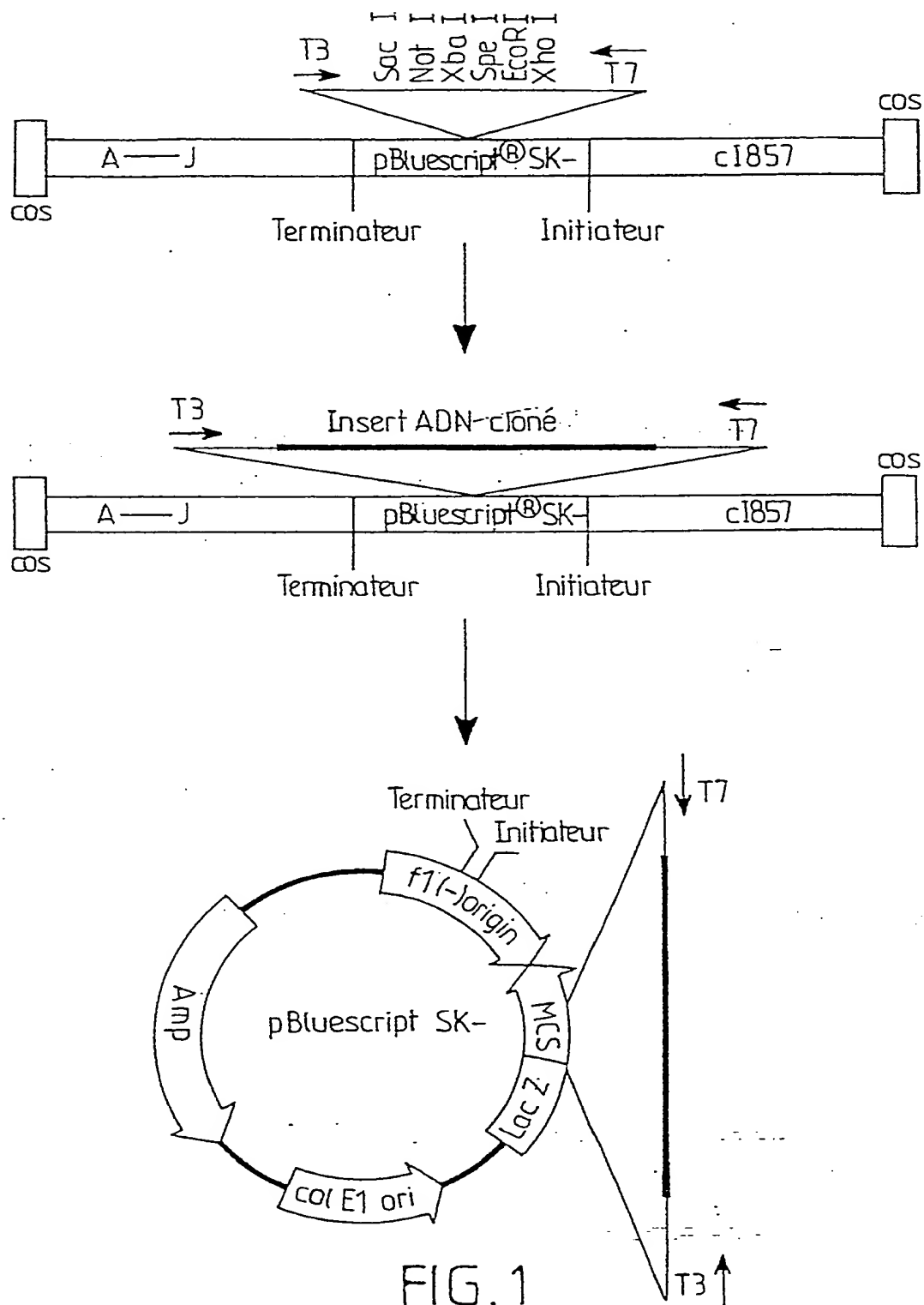
- iii) Le précurseur de la sous-unité Tbp1 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu méthionine en position -24 et finissant avec le résidu phénylalanine en position 887 ; ou
 - iv) Le précurseur de la sous-unité Tbp2 de la souche IM2169 dont la séquence en acides aminés est montrée dans le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu méthionine en position -20 et finissant avec le résidu glutamine en position 691.
8. Une cassette d'expression destinée à la production d'une protéine capable d'être reconnue par un antisérum anti-récepteur de la transferrine de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169, qui comprend un fragment d'ADN selon l'une des revendications 1 à 7, placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.
 9. Une cellule-hôte transformée par une cassette d'expression selon la revendication 8.
 10. Un procédé de production d'une protéine capable d'être reconnue par un antisérum anti-récepteur de la transferrine de la souche de *N. meningitidis* IM2394 ou IM2169, qui comprend l'acte de cultiver une cellule-hôte selon la revendication 9.
 11. Un bloc d'ADN isolé codant pour un peptide signal ayant une séquence d'acides aminés homologue à celle telle que montrée dans :
 - le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu en position - 1.
 - le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu alanine en position - 1 ; et
 - le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu méthionine en

position - 20 et finissant avec le résidu alanine en position - 1.

12. Un bloc d'ADN isolé codant pour un peptide signal ayant une séquence d'acides aminés telle que montrée dans :

- le SEQ ID NO : 2, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu en position - 1 ;
- le SEQ ID NO : 3, commençant avec le résidu méthionine en position - 24 et finissant avec le résidu alanine en position - 1 ; et
- le SEQ ID NO : 4, commençant avec le résidu méthionine en position - 20 et finissant avec le résidu alanine en position - 1.

1/10



2/10

EcoRI,1

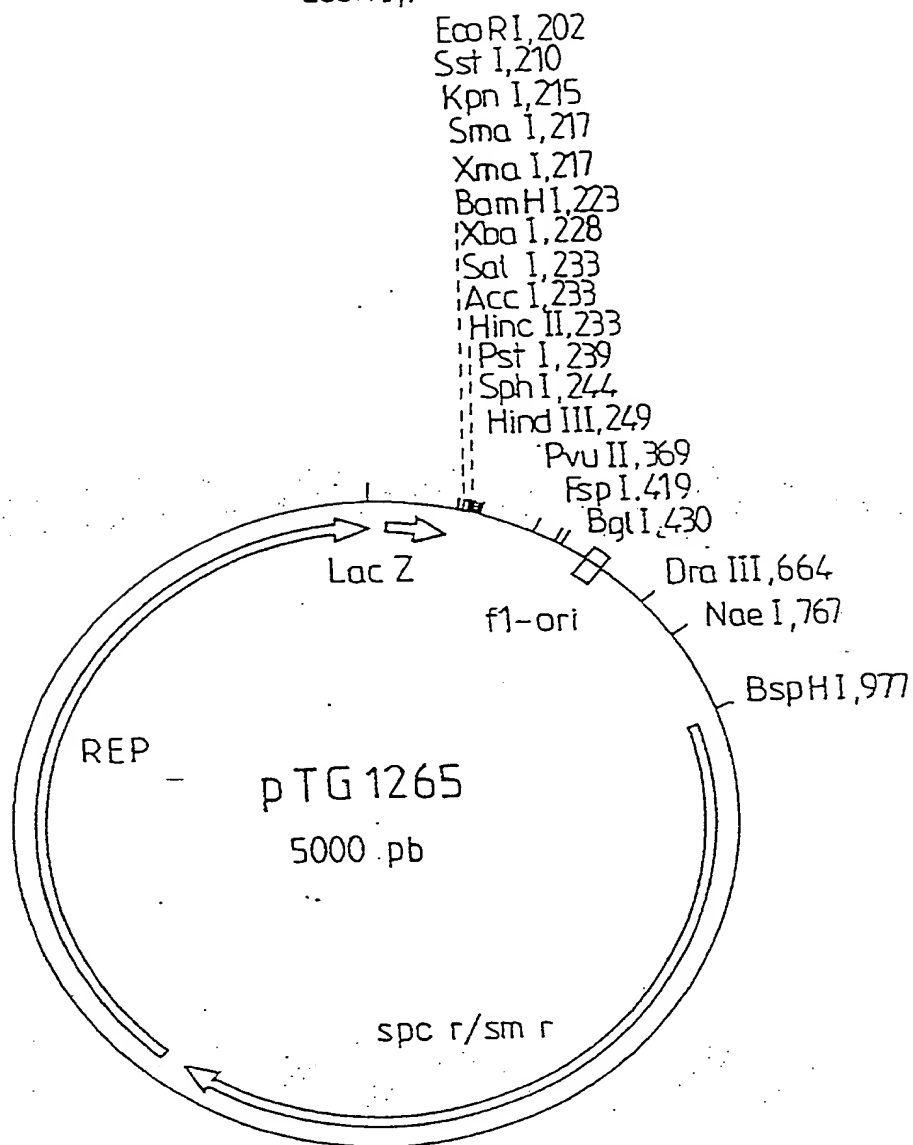


FIG. 2

3/10

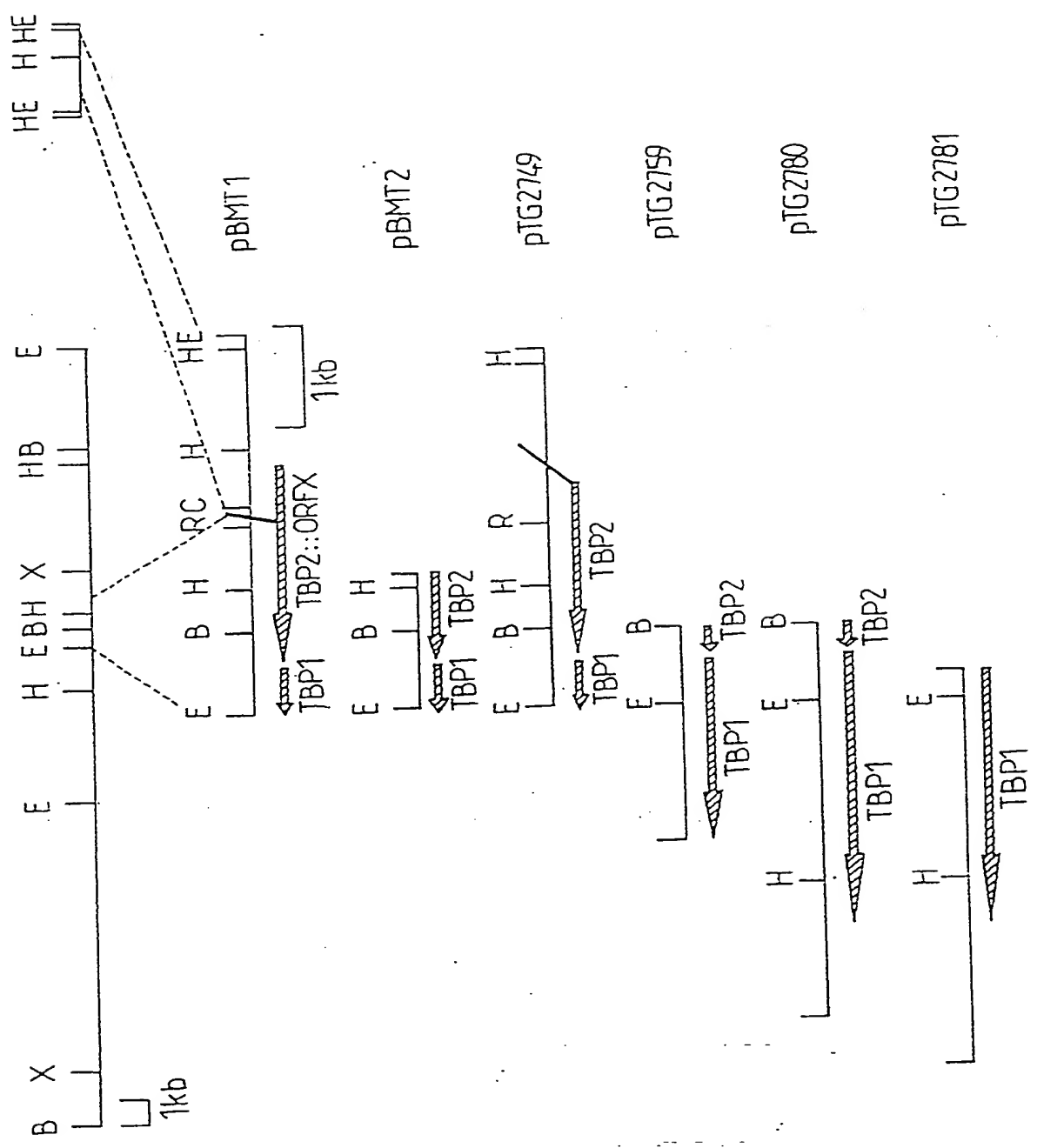


FIG. 3

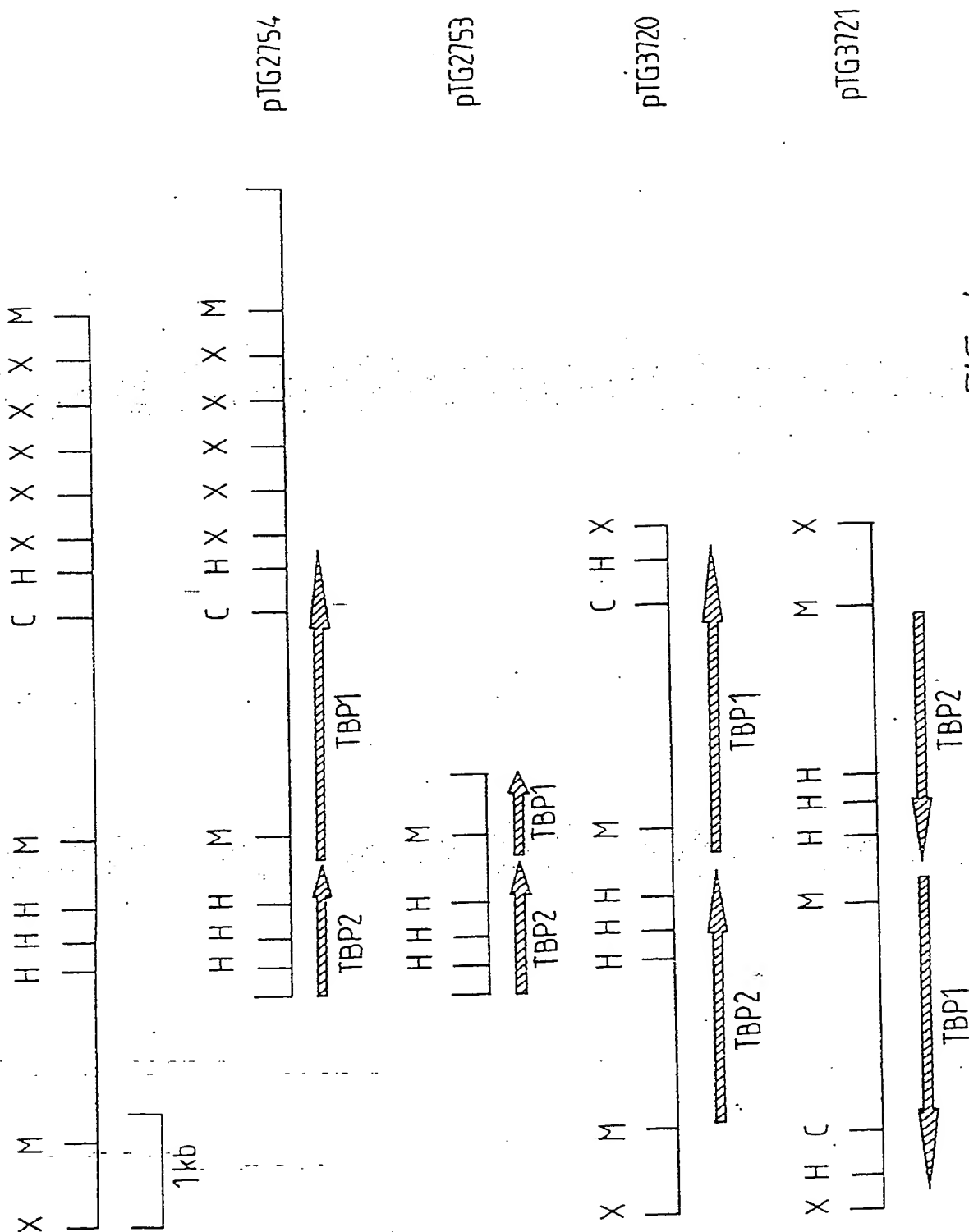


FIG. 4

5/10

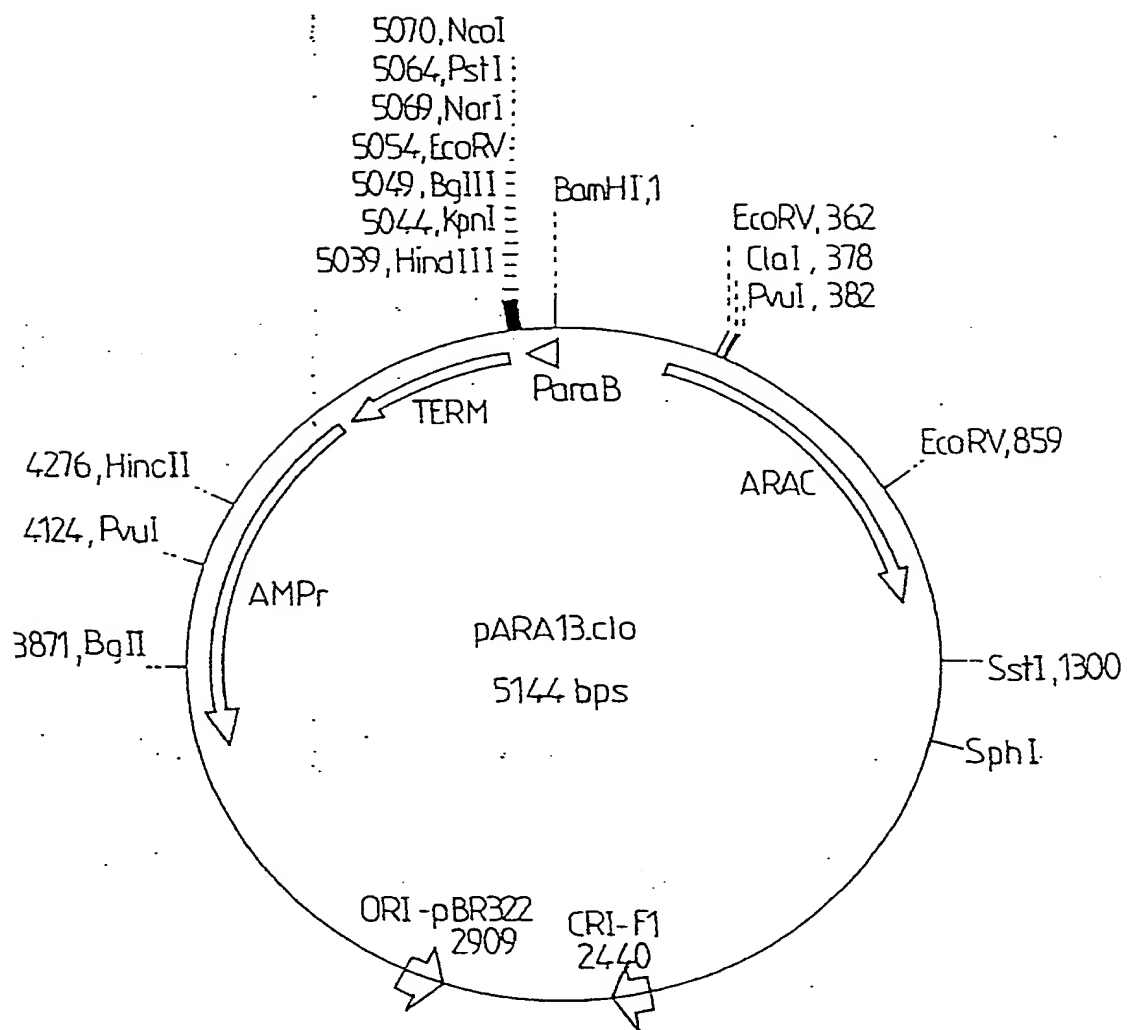


FIG. 5



7/10

| | |
|-----------|---|
| Tbp1-2394 | MQQOHLFRNLCLSLMTALPVYAENVOAEQAQEKOLDTIQVKAKKOKTRRDNEVTGLGK |
| Tbp1-2169 | MQQOHLFRNLCLSLMTALPAYAENVGAGQAQEKOLDTIQVKAKKOKTRRDNEVTGLGK |
| Tbp1-2394 | LVKSSDTLSKEQVLNIRDLTRYPGIAVVEQGRGASSGYSIRGMDKNRVSLTVDGVSQIQ |
| Tbp1-2169 | LVKTAOTLSKEQVLDIRDLTRYPGIAVVEQGRGASSGYSIRGMDKNRVSLTVDGLAQIQ |
| Tbp1-2394 | SYTAQAALGGTRTAGSSGAINIEIYENVKAVEISKGSNSSEYGNALAGSVAFOTKTAAD |
| Tbp1-2169 | SYTAQAALGGTRTAGSSGAINIEIYENVKAVEISKGSNSVEQSGALAGSVAFOTKTAAD |
| Tbp1-2394 | IIGECKQWGIQSKTAYSGKDHALTOSIALAGRSGGAELLIYTKRRGREIHAKXDAGKGV |
| Tbp1-2169 | VIGEGRQWGIQSKTAYSGKNRGLTQSIALAGRIGGAELLIHTGRRAGEIRAHEDAGRGV |
| Tbp1-2394 | QSFNRLVLDDEKKEGGSQYRYFIVEEHC-NGYAACKNKLKEDASVKDERKTVSTQDYTC |
| Tbp1-2169 | QSFNRLVPVED----SSEYAYFIVEDECEGKNYETCKSKPKXDVVGKDERQTVSTRDYTC |
| Tbp1-2394 | SNRLLANPLEYGSOSWLERPGWHLDN-RHYVGAVLERTQOTFDTRDMTPPAYFTSEDYVP |
| Tbp1-2169 | PNRFLADPLSYESRSWLERPGFERFENKRHYIGGILEHTQOTFDTRDMTPPAFLTKAVFDA |
| Tbp1-2394 | -----GSLXGLGKXSGDNKAERLFVQEGSTLOGIGYGTGVFYDERHTKNRYGVEYVYHN |
| Tbp1-2169 | NSKQAGSLPGNGKYAGNHKYGGLEFNGENGALVGAZYGTGVFYDEHTKSRYGLEYVYTN |
| Tbp1-2394 | ADKDTWADYARLSYDROGIDLNRLOQTHCSHDGSDKNCRPDGKNKPYSFYKSDRMHYEES |
| Tbp1-2169 | ADKDTWADYARLSYDROGIGLDNHFQOQTHCSADGSDKYCRPSADKFFSYKSDRVITYGES |
| Tbp1-2394 | RNLFOAVEFKAFDTAKIRHNLSINLGYDRFKSOLSHSDYYLQNAVQAYDLITPKKPPFPN |
| Tbp1-2169 | ERLLQAAFKKSFDTAKIRHNLSVNLGDFRFDNLRHQDYVYQHANRAYSSKTPPKTANPN |
| Tbp1-2394 | GSKDNPYRVSIGKTTVNTSPICRFGNNTYTDCTPRNIGGNGYAAVQDNVRLGRWADVGA |
| Tbp1-2169 | GDKSKPYWVSIGGGNVVTQICLFGNNTYTDCTPRNSINGKSYAAVRDNVRLGRWADVGA |

FIG.7

8/10

| | |
|-----------|--|
| Tbp1-2394 | GIRYDYRSTHSEDKSVSTGTHRNLSWNAGVVLXPFTWMDLTYRASTGFRLPSEAEYGWR |
| Tbp1-2169 | GLRYDYRSTHSDOGSVSTGTHRTLWNAGIVLKPADWLDLTYRTSTGFRLPSEAEYGWR |
| Tbp1-2394 | AGESLKTLDLKPEKSFNREAGIVFKGDFGNLEASYFNNAYRDLIAFGYETRTONGOTSAS |
| Tbp1-2169 | SGVQSKAVKIDPEKSFNKEAGIVFKGDFGNLEASWFNNAYRDLIVRGYEAQLKNGKEEAK |
| Tbp1-2394 | GDPCYRNAQNARIAGINILGXIDWHGVWGGLPDGLYSTLAYNRKXVDADIRADRTFVTS |
| Tbp1-2169 | GDPAYLNAQSARITGINILGXIDWNGVWOKLPEGWYSTFAYNRVHVRIKKRADRTDIOS |
| Tbp1-2394 | YLFDAVQPSRYVLGLGYDHPDGIWGINTEFTYSKAKSVDELLGSOALLNGNANAKKAASR |
| Tbp1-2169 | HLFDAIQPSRYVWGLGYDOPEGKXGVNGHLYTSKAKEITELLGSRALLNGNSRNTKATAR |
| Tbp1-2394 | RTRPWYVTDVSGYYNIXKHLTLRAGVYNLLNYRYVTWENVROTAGGAVNQHXNVGVYNRY |
| Tbp1-2169 | RTRPWYVTDVSGYYTIKKHFTLRAGVYNLLNYRYVTWENVROTAGGAVNQHXNVGVYNRY |
| Tbp1-2394 | AAPGRNYTFSLDCKF |
| Tbp1-2169 | AAPGRNYTFSLDCKF |

* = acide aminé identique
 . = changement conservatif

FIG: 7(suite)

9/10

| | |
|-----------|---|
| Tbp2-2394 | CLGGGGSFDLDSVETVCCMHKPKYEDKSO-PESQDDVSENSCAAYGFVAVKLPBRNAHF |
| Tbp2-2169 | CLGGGGSFDLDSVDT-EAPRPAPKYQOVSSSEKPOAQKD----QG-GYGFAMRLKRN--W |
| Tbp2-2394 | NPKYKEKHKPLGSMWKKLO-RGEPNSFSEKDE--LEKXR--G-----SSE-LIESKWD |
| Tbp2-2169 | YPGAEESEVKLNESDWEATGLPTKPKELPKROKSVIEKVTGDGSDIYSSPYLTPSNHON |
| Tbp2-2394 | G-----Q--SRVVGYNFTYVRSGLVYLNK--NNIDIKNNIVLFGPDGYLYYXGKEPSK |
| Tbp2-2169 | GSAGNGVNOQPKNOATGHEFQYVYSGFYKHAASEKDFSNKKIXSGDDGYIFYHGEKPSR |
| Tbp2-2394 | ELP-SEKITYXGTWDTYVTDAMEKQRF-EG--GSAAGGDKSGALSALZEGVLRNOAEAS-- |
| Tbp2-2169 | QLPASGKVIYKGVWHEFVDTKKQDFREIIOPSKKQGDYSGFSGDGSZEYSNKNESTLK |
| Tbp2-2394 | SGHTDFGMTSEFEVDFSDKTIKGTLYRNRRITONNSENKQIKTTRYTIQATLHGHRFXGK |
| Tbp2-2169 | DOHEGYGFTSNLEVDFGNKKLTGKLIRNNASLNNNTNNDKHTTQYYSLDAQITGNRENGT |
| Tbp2-2394 | ALAADKGATNGS-HPFISDSOSLEGGFYGPKEELAGKFLSNDNKVAAVFGAKQKDKKDG |
| Tbp2-2169 | ATATDKKENETKLPFVSOSSSLSGGFFGPOGEELGFRFLSDQKVAVVGSAKTKDKLEN |
| Tbp2-2394 | EN-----AAGPATE-----TVIDAYRITGEEFKKEQIDSPGDVXKLLVDGVE |
| Tbp2-2169 | GAAASGSGTGAASGGAAGTSSSENSKLTIVLDAVELTLNDKXIKNLDNFSNAAQLVVDGIM |
| Tbp2-2394 | LSLLPSEGNKAA-----FOHIE-----ONGVKAT----- |
| Tbp2-2169 | IPLLPKDSSESGNTQADKGNKGTEFTKKEHTPESDKKDAQAGTQTNGAQTASNTAGCTN |
| Tbp2-2394 | -----VCCSNLDVMSFGKLSKEN-K-----DCMFLOGVRTP |
| Tbp2-2169 | GXTKTYEVEVCCSNLNYLKYGLTRKNSKSAHQAGGNSSQADAKTEQVEQSMFLOGERTD |
| Tbp2-2394 | VSDVAARTEANAKYRGTYGYIANGTWSGGEASNOEGGNRAEFDVDFSTKKISGTLTAKD |
| Tbp2-2169 | EKEIP--TDQNVVYRGSHYGHANGTWSGNASDKKGGNRAEFTVNFADKKITGKLTASN |
| Tbp2-2394 | RTSPAFTITAMIKDNGFSGVAKTGENGFALDPONTGNSHYTHI-EATVSCGFYGNNAIEM |
| Tbp2-2169 | RQAQTFTIEGMIOGNFEGTAKTAESGFDLDQKNITRTPKAYITDAKVKGGFYGPKAEEEL |
| Tbp2-2394 | GGSFSPGNAPECKOE-----KASVVEGAKRQQLVQ |
| Tbp2-2169 | GGWFAYPGDKQTEKATATSSDGNSSASSATVVEGAKRQOPVQ |

* = acide aminé identique
 . = changement conservatif

FIG. 8

10/10

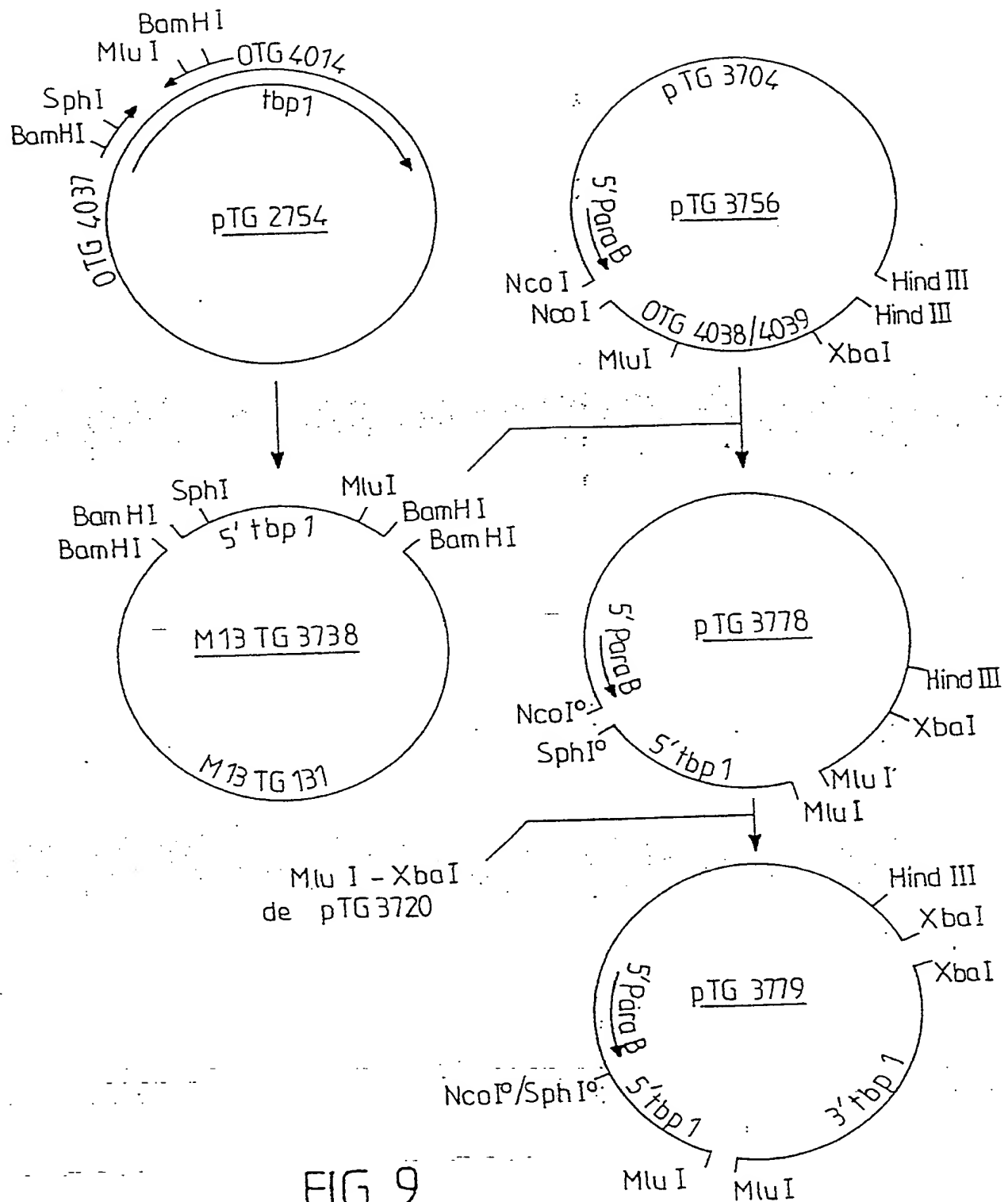


FIG. 9

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9207493
FA 474262

| DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS | | Revendications concernées de la demande examinée |
|---|---|---|
| Catégorie | Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes | |
| X | INFECTION AND IMMUNITY vol. 60, no. 6, Juin 1992, pages 2391 - 2396 Stevenson P; Williams P; Griffiths E; 'Common antigenic domains in transferrin -binding protein 2 of Neisseria -Meningitidis Neisseria -Gonorrhoeae and Haemophilus-Influenzae Type B.' * le document en entier * | 1 |
| D,X | WO-A-9 012 591 (UNIVERSITY TECHNOLOGIES INTERNATIONAL, INC.; US) 1 Novembre 1990 * le document en entier * | 1 |
| X | WO-A-9 203 467 (THE UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA, US) 5 Mars 1992 * revendications 1-17; figure 2A * | 1,11,12 |
| | | DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL5) |
| | | C12N C07K |
| Date d'achèvement de la recherche 28 JANVIER 1993 | | Examinateur S.A. NAUCHE |
| CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES | | |
| X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document intercalaire | | |
| T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant | | |